



Estudio de procesos de Migración y Plasticidad en el Sistema Nervioso Central: Papel de Semaforina 4F y kinasa de adhesión focal (FAK)

Beatriz García García

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

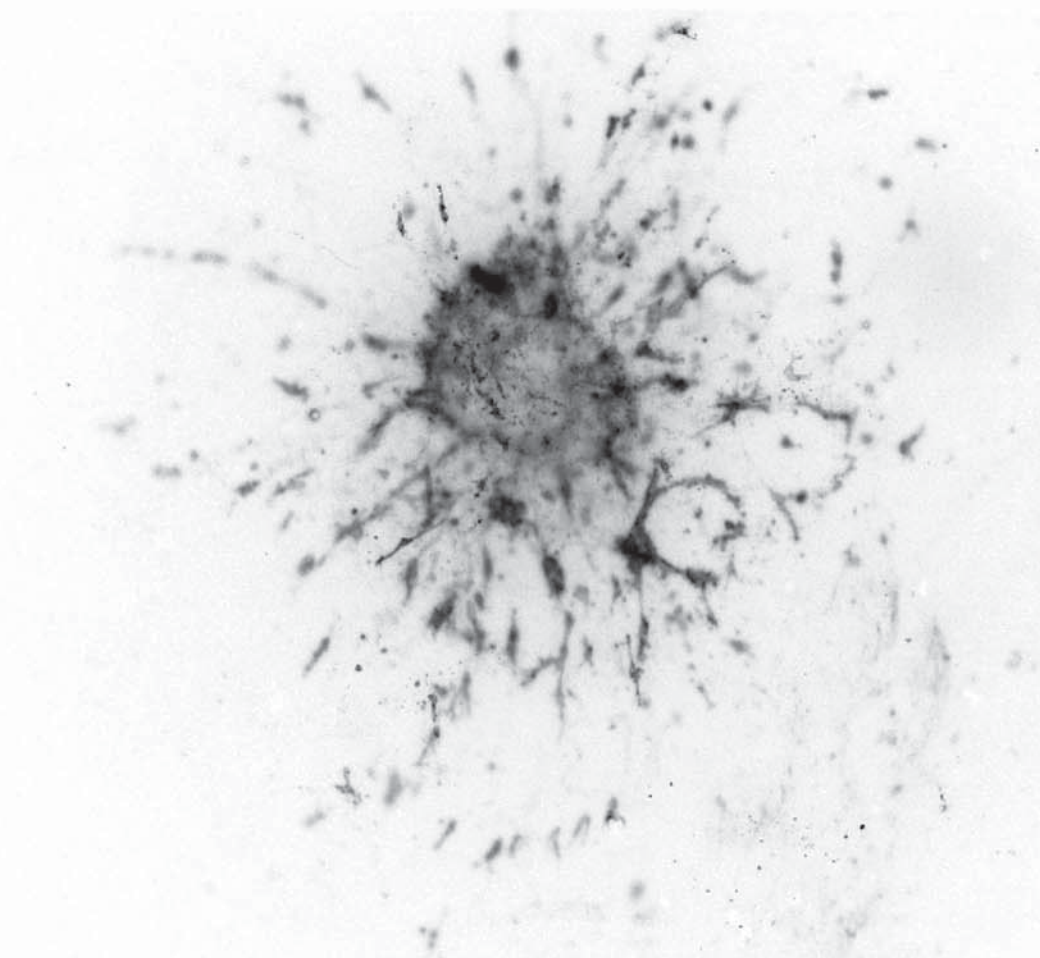
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Estudio de Procesos de Migración y Plasticidad en el Sistema Nervioso Central:

Papel de Semaforina 4F y Kinasa de Adhesión Focal (FAK)

Tesis Doctoral
Beatriz García García
Diciembre 2012



UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
PARQUE CIENTÍFICO DE BARCELONA

Estudio de procesos de Migración y Plasticidad en el Sistema Nervioso Central: Papel de Semaforina 4F y kinasa de adhesión focal (FAK).

Beatriz García García
Barcelona, Diciembre 2012

Programa de Doctorado en Biomedicina
Bienio 2008-2009

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
PARQUE CIENTÍFICO DE BARCELONA

Estudio de procesos de Migración y Plasticidad en el Sistema Nervioso Central: Papel de Semaforina 4F y kinasa de adhesión focal (FAK).

Memoria presentada por **Beatriz García García**, licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona.

Los estudios de tercer ciclo se han enmarcado en el programa de doctorado en Biomedicina, bienio 2008-2009, de la Universidad de Barcelona y el proyecto de Tesis Doctoral está adscrito al Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de esta memoria han sido dirigidos y supervisados por el **Dr. Ferran Burgaya i Màrquez**, Profesor Titular del departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, y por el **Dr. Eduardo Soriano García**, Catedrático del departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

Barcelona, Diciembre de 2012.

Visto bueno de los directores de Tesis:

La candidata a Doctora:

Dr. Ferran Burgaya i Màrquez Dr. Eduardo Soriano García

Beatriz García García

A todos vosotros, ya sabéis quiénes, que me habéis ayudado en este largo
camino:

GRACIAS.

Meanwhile, in the outside world...



“What we know is a drop,
what we don’t know is an ocean.”
I. Newton

“It always seems imposible until it is done.”
N. Mandela

“In the end,
it’s not the years in your life that count,
it’s the life in your years.”
A. Lincoln

A mis padres y mi hermano.
A Carles.

Índice General

Título	1
Índice	11
Índice general	11
Lista de figuras y tablas	15
Glosario	19

INTRODUCCIÓN

21

1. Desarrollo del Sistema Nervioso de Mamíferos.	23
1.1. Neurogénesis	23
1.2. Oligodendrogénesis	24
2. Migración celular.	27
2.1. Migración Neuronal	27
2.2. Migración de Oligodendrocitos.	30
3. Moléculas de guía: Semaforinas	34
3.1. Estructura de las semaforinas	35
3.2. Señalización por semaforinas	35
3.3. Semaforinas transmembranales	37
4. Señalización intracelular: FAK	39
4.1. Estructura de FAK	39
4.2. Activación y mecanismos de señalización de FAK	40
4.3. Procesamiento postranscripcional de FAK	42
4.4. Adhesiones focales	43
5. Funciones de FAK en SN.	47
5.1. El cono de crecimiento y la guía axonal	47
5.2. Ramificación axonal y plasticidad sináptica	49
6. FAK en Oligodendrocitos	51

OBJETIVOS

53

RESULTADOS

57

Capítulo 1: Expresión de la Semaforina 4F en neuronas y oligodendrocitos del cerebro y regulación de la migración de precursores de oligodendrocitos en el nervio óptico	59
1.1. Análisis de la expresión del transcrito de Sema4F en el cerebro de ratón durante el desarrollo	61

1.2. Distribución de la proteína Sema4F en el cerebro en desarrollo.	63
1.3. Expresión de Sema4F en células neuronales y oligodendrogiales	67
1.4. Papel de Sema4F en la migración de OPCs de nervio óptico durante el desarrollo	71
1.5. Sema4F no afecta a la proliferación de OPCs pero induce su diferenciación	72
Capítulo 2: Vía de señalización de Sema4F en OPCs: papel de FAK	75
2.1. Detección de FAK en oligodendrocitos	77
2.2. Efectos de FAK en la inhibición de la migración mediada por Sema4F	79
Capítulo 3: Detección y análisis de las isoformas de FAK expresadas preferencialmente en cerebro	81
3.1. Detección de las isoformas de FAK mediante Western Blot.	83
3.2. Detección específica de las isoformas de FAK mediante hibridación con sondas radiactivas	84
Capítulo 4: Estudio de procesos de ramificación axonal: papel de FAK y Ack1	87
4.1. Estudio de la interacción entre FAK y Ack1	89
4.2. Análisis de la fosforilación de FAK y Ack1	91
4.3. Tratamientos de cultivos primarios de hipocampo con Net-1	92
4.4. Explantes de hipocampo electroporados con shAck1	92
Capítulo 5: Estudio de las fosforilaciones de FAK y Ack1 mediante Espectrometría de Masas (MS)	97
5.1. Detección de proteínas que interaccionan con FAK y Ack1 por MS	99
5.2. Análisis de la fosforilación de FAK y Ack1 por MS	106
RESUMEN DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN	111
Capítulo 1: Expresión de la Semaforina 4F en neuronas y oligodendrocitos del cerebro y regulación de la migración de precursores de oligodendrocitos en el nervio óptico	113
1.1. La semaforina 4F se expresa en neuronas, oligodendrocitos y sus precursores durante el desarrollo del sistema nervioso	113
1.2. Sema4F inhibe la migración de oligodendrocitos y estimula su diferenciación	114
Capítulo 2: Vía de señalización de Sema4F en OPCs: papel de FAK	116
2.1. Sema4F activa FAK en OPCs	116
2.2. FAK está implicado en la migración pero no en la diferenciación mediada por Sema4F	117

Capítulo 3: Isoformas de FAK	120
Capítulo 4: Interacción de FAK y Ack1	122
4.1. FAK y Ack1 interaccionan <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	122
4.2. FAK y Ack1 son requeridas para su activación	122
4.3. FAK y Ack1 responden a Net-1	123
Capítulo 5: Análisis de FAK y Ack1 por MS	124
 CONCLUSIONES	 127
 MATERIALES Y MÉTODOS	 131
 BIBLIOGRAFÍA	 141
 ANEXO I: Tablas de proteínas encontradas en los experimentos de MS	 157
 ANEXO II: Publicación derivada de esta Tesis Doctoral	 165
 FINANCIACIÓN disfrutada para la elaboración de esta Tesis Doctoral	 169

Lista de Figuras y Tablas

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Gliogénesis en las zonas progenitoras embrionarias y adultas.	24
Figura 2. Esquema de las etapas de maduración de los oligodendrocitos.	26
Figura 3. Desarrollo embrionario de la corteza cerebral.	28
Figura 4. Ejemplos de rutas de migración neuronal.	29
Figura 5. Ciclo de las GTPasas.	30
Figura 6. Generación de oligodendrocitos en la espina dorsal y oleadas de producción en el telencéfalo de ratón.	31
Figura 7. Distribución espaciotemporal de la colonización del ON.	32
Figura 8. Esquema de la estructura primaria de los diferentes miembros de la familia de semaforinas.	34
Figura 9. Componentes de la cascada de señalización de Sema3A-plexinaA1.	36
Figura 10. Estructura en dominios y sitios de fosforilación de la proteína FAK.	39
Figura 11. Modelos actuales de activación de FAK por integrinas.	40
Figura 12. Organización y procesamiento postranscripcional del gen de FAK, <i>ptk2</i> .	43
Figura 13. Esquema de la interacción entre la ECM y la célula a través de los macrocomplejos proteicos llamados contactos focales.	44
Figura 14. La adhesión mediada por integrinas activa la familia de proteínas RhoGTPasas.	45
Figura 15. RhoGTPasas en crecimiento axonal.	46
Figura 16. Modelo de funcionamiento de FAK en el colapso axonal mediado por Sema3A.	48
Figura 17. Las espinas dendríticas son los sitios primarios de sinapsis excitatorias en el cerebro.	51

RESULTADOS

Capítulo 1

Figura 1.1. Distribución mediante ISH del transcrito Sema4F durante el desarrollo.	61
Figura 1.2. Detección de Sema4F por NB y análisis inmunoquímico.	63
Figura 1.3. Análisis inmunohistoquímico de Sema4F durante el desarrollo.	65
Figura 1.4. IR anti-4F en varias áreas del hipocampo adulto.	66
Figura 1.5. Hipocampos de ratón adulto inmunomarcados para microscopía electrónica.	67

Figura 1.6. Comparación de los patrones de expresión de Sema4F a mayor aumento.	68
Figura 1.7. Marcaje doble con anti-4F y anti-Olig2 en cortes de cerebro E16.5.	69
Figura 1.8. Expresión de Sema4F en precursores de oligodendrocitos de nervio óptico.	70
Figura 1.9. Sema4F regula la migración de oligodendrocitos en explantes de nervio óptico.	71
Figura 1.10. Sema4F no afecta a la proliferación de OPCs, aunque acelera su diferenciación	73
Tabla 1.I. Expresión de Sema4F en el cerebro de ratón a lo largo del desarrollo.	62
 Capítulo 2.	
Figura 2.1. WB de FAK fosforilado en diferentes residuos.	77
Figura 2.2. Cambios en la fosforilación de FAK en OPCs al tratar con Sema4F.	78
Figura 2.3. Inmunodetección de FAK en cultivos de OPCs tratados con medio control o medio 4F.	79
Figura 2.4. Efecto del inhibidor de FAK en la migración de OPCs tratados con medio condicionado de Sema4F.	80
 Capítulo 3.	
Figura 3.1. Detección de las isoformas de FAK mediante WB.	83
Figura 3.2. Detección de isoformas de FAK en distintas áreas del cerebro y en distintos estadios del desarrollo.	85
Figura 3.3. Detección de isoformas de FAK en los tres tipos celulares mayoritarios del cerebro.	86
Tabla 3.I. Relación de las sondas utilizadas y las isoformas de FAK que reconoce cada una.	84
 Capítulo 4.	
Figura 4.1. Estudio de la interacción entre FAK y Ack1.	90
Figura 4.2. Inmunodetección de FAK y Ack1 en neuronas.	90
Figura 4.3. Estudio de la fosforilación de FAK.	91
Figura 4.4. Estudio de la fosforilación de Ack1.	91
Figura 4.5. Respuesta a Net-1 de FAK y Ack1.	92
Figura 4.6. Análisis de la represión de ACK1 por el silenciamiento de sh50Ack1 en neuronas de hipocampo.	93
Figura 4.7. Respuesta a Net-1 de explantes de hipocampo electroporados con sh50 Ack1.	94

Figura 4.8. Medida de la longitud axonal en respuesta a Net-1	95
--	----

Capítulo 5.

Figura 5.1. Espectro obtenido para un péptido de FAK.	99
Figura 5.2. Secuencia de FAK y péptidos encontrados en la condición PTZ.	100
Figura 5.3. Detección por inmunofluorescencia de FAK, Ack1 y drebrina.	106
Figura 5.4. Secuencia de Ack1 y péptidos encontrados en la condición P5.	108
Tabla 5.I. Selección de las principales proteínas encontradas en los experimentos de MS.	101
Tabla 5.II. Resumen de los residuos fosforilados de FAK encontrados mediante MS.	107
Tabla 5.III. Resumen de las tres fosforilaciones encontradas por MS en muestras de cerebros P5 inmunoprecipitados con anti-Ack1.	108
Tabla 5.IV. Predicción de fosforilaciones de FAK y Ack1	109

ANEXO 1

Tabla A.I. Proteínas obtenidas en la inmunoprecipitación de FAK en muestras de cerebros P5	159
Tabla A.II. Proteínas obtenidas en la inmunoprecipitación de FAK en muestras de cerebros adultos control o tratados con PTZ	160
Tabla A.III. Proteínas obtenidas en la inmunoprecipitación de Ack1 en muestras de cerebros P5	161
Tabla A.IV. Proteínas obtenidas en la inmunoprecipitación de FAK en muestras de cerebros adultos control o tratados con PTZ	162
Tabla A.V. Correspondencia en la nomenclatura de los residuos de la proteína FAK en humanos y en ratón	163

Glosario

Ack1 Kinasa-1 de interacción con Cdc42 activado
AMPA *α -amino- 3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*
BDNF Factor de crecimiento neuronal derivado de cerebro
BMP Proteína morfogénica del hueso
CaMKII Kinasa dependiente de Calcio/calmodulina
Cdk5 Kinasa 5 dependiente de ciclina
ECM Matriz extracelular
ERK Kinasa regulada por señales extracelulares
FAK Kinasa de Adhesión Focal
FGF Factor de crecimiento fibroblástico
GAP Proteína de activación de GTPasas
GDNF Factor de crecimiento neuronal derivado de glía
GEF Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
GFP Proteína verde fluorescente
GTPasas Guanosín trifosfatasas
GSK3 Glucógeno sintasa kinasa 3
Hp Hipocampo
MAPK Proteín kinasa activada por mitógenos
MBP Proteína Básica de la Mielina
N-WASP Proteína del Síndrome Neuronal de Wiskott-Aldrich
NCAM Molécula de adhesión celular neural
NMDA *Ca^{2+} influx through *N*-methyl-*D*-aspartate– receptor*
ON Nervio óptico
OPCs Células precursoras de oligodendrocitos
PDGF Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PSD Densidad postsináptica
PSD-95 Proteína de densidad postsináptica de 95KDa
RGCs Células gliales radiales
RMS Vía migratoria rostral
Shh *Sonic Hedgehog*
SH Homólogo a Src
SNC Sistema Nervioso Central
SNP Sistema Nervioso Periférico
SVZ Zona subventricular
TMB Transmembranal
VZ Zona ventricular

INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo del Sistema Nervioso de los Mamíferos

El Sistema Nervioso (SN) es responsable de la percepción e interacción del organismo con el medio que lo rodea. Se trata de una de las estructuras más sofisticadas que existen, con complejas redes y conexiones neuronales cuya arquitectura puede ser modificada por procesos como el aprendizaje y la memoria.

El desarrollo de una estructura tan compleja como el cerebro desde el embrión hasta el organismo adulto es un proceso que pasa por varias etapas que se solapan: En primer lugar, la proliferación de células madre neurales embrionarias en el neuroepitelio ventricular produce el crecimiento de la estructura; después tiene lugar una fase neurogénica que da lugar a las neuronas; en tercer lugar se produce la gliogénesis y finalmente la mielinización, la estabilización y el refinamiento sinápticos, y la apoptosis y remodelación axonal, que completan el proceso de maduración del cerebro. Un momento crítico es la adecuada integración de los distintos tipos celulares para formar las estructuras cerebrales maduras.

El SN deriva del ectodermo, la capa más externa del embrión, que dará lugar a la epidermis y al neuroectodermo. La señalización de células mesodérmicas de la notocorda provoca la aparición de la placa neural, a partir del neuroectodermo, en un proceso llamado INDUCCIÓN NEURAL. La placa neural, que tras plegarse dará lugar al tubo neural, es la fuente de las neuronas y de las células gliales. La parte superior del tubo neural dará lugar al mesencéfalo (cerebro medio) y al prosencéfalo (futuro cerebro anterior), y más caudalmente se generará el romboencéfalo. El prosencéfalo derivará en el telencéfalo (hemisferios cerebrales) y el diencefalo.

El telencéfalo es la división más compleja del cerebro. Se puede dividir en dos dominios, dorsal (palial) y ventral (subpalial). Las dos estructuras principales del *pallium* son la corteza o córtex cerebral y el hipocampo. Del *subpallium* derivan los ganglios basales, que provienen de dos protuberancias en la pared del ventrículo lateral, las eminencias ganglionares medial (MGE) y lateral (LGE). Una tercera eminencia, la caudal (CGE), parece que da lugar a la región amigdaloides del sistema límbico [1].

El SN adulto se divide en Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP). El SNC lo forman la médula espinal y el encéfalo (cerebro, puente y bulbo raquídeo) mientras que el SNP está constituido por los nervios eferentes del SNC y los ganglios nerviosos.

El SN está compuesto por dos grandes tipos celulares: neuronas y células gliales o glía.

1.1. Neurogénesis

Las neuronas son las células responsables de la transmisión del impulso nervioso. En el cerebro de los mamíferos, sus somas o cuerpos celulares se agrupan en la sustancia gris, mientras que sus axones, mielinizados, conforman la sustancia blanca. La generación de neuronas, o NEUROGÉNESIS, tiene lugar fundamentalmente durante el desarrollo, aunque en el adulto quedan algunos focos neurogénicos en el giro dentado del hipocampo y en el bulbo olfativo [2]. Durante el desarrollo, las neuronas se generan en el epitelio proliferativo que recubre el tubo neural (neuroectodermo). Sobre el día 9-10 de desarrollo embrionario en ratón (E9-10) comienzan una serie de oleadas de neurogénesis desde regiones caudales de la espina dorsal, que se propagan rostralmente, así como a lo largo de gradientes ventro-dorsales y latero-mediales en el cerebro [3]. El primer tipo de progenitor que se genera durante la embriogénesis, a partir de células neuroepiteliales, es las células de la glía radial, que se diferenciarán en neuronas y en macroglía

(astrocitos y oligodendrocitos). La glía radial se divide asimétricamente para dar lugar a neuronas o progenitores intermedios (Fig.1 y [3]).

La mayor zona germinativa durante el desarrollo embrionario y postnatal es la zona ventricular (VZ), un epitelio pseudo-estratificado que contiene células madre neurales proliferativas o progenitores intermedios. Durante las primeras semanas de vida estas células desaparecen gradualmente y dan lugar a los tipos celulares adultos de la pared ventricular, que incluyen las células ependimales no proliferativas identificadas como GFAP⁺. Estas células están en contacto con el ventrículo y se piensa que son las células madre neurales postnatales, la glía radial que conforma la VZ adulta [4, 5]. Existe una segunda zona germinal, la ZONA SUBVENTRICULAR (SVZ), que se desarrolla en etapas más tardías del embrión bajo el ventrículo lateral, y participa en la expansión del cerebro anterior [6, 7]. La SVZ adulta incluye cuatro tipos celulares: una monocapa de células ependimales en contacto con el ventrículo; astrocitos; neuroblastos en proceso de migración hacia el bulbo olfativo (por la vía migratoria rostral, RMS); y progenitores transitorios. La tercera zona germinativa en ratón es el labio róbico, una matriz especializada localizada en el extremo posterior del primordio cerebelar. Da lugar a las células granulares del cerebelo [8].

1.2. Oligodendrogénesis

Las células de la glía son las más abundantes del cerebro, donde suponen el 60-70% en ratones y hasta el 90% en el caso del cerebro humano [9]. Las funciones de las células de la glía incluyen, aunque no se limitan a, las de soporte, nutrición y aislamiento neuronal. En los últimos años se han identificado sorprendentes funciones de estas células en la plasticidad estructural y funcional del cerebro [10, 11] .

La glía se subdivide en macroglía (astrocitos, oligodendrocitos y células ependimales), que como las neuronas derivan del neuroectodermo, y microglía, que deriva del mesodermo y se compone de macrófagos infiltrados [9]. La gliogénesis se inicia a partir de células neuroepiteliales en el embrión, que pasan por varias etapas como se muestra en la figura 1:

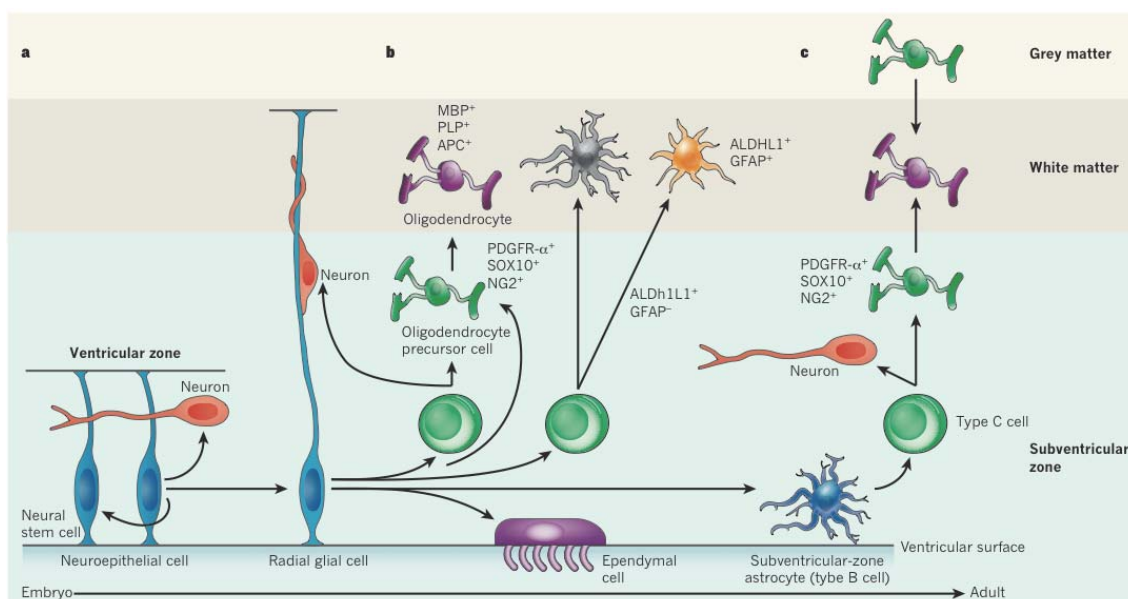


Figura 1. Gliogénesis en las zonas progenitoras embrionarias y adulta. Se puede ver la progresión desde el embrión hasta el adulto de izquierda a derecha (A a C). **A.** Las células neuroepiteliales auto-progenitoras se extienden a lo largo del eje neural durante el cierre del tubo neural, y pueden generar algunas neuronas. Las

células neuroepiteliales se transforman en células de la glía radial en cuanto empieza la neurogénesis. **B**, La glía radial produce células intermedias progenitoras y precursores de oligodendrocitos (OPCs), que a su vez producen neuronas y oligodendrocitos, respectivamente. La glía radial también puede generar astrocitos y progenitores intermedios que se expanden antes de producir astrocitos, así como células ependimales. **C**, En el adulto, los oligodendrocitos se generan a partir de dos vías independientes: las células tipo-B de la SVZ producen células amplificantes (tipo C) que a su vez producen tanto OPCs como neuronas. Los OPCs después dan lugar a oligodendrocitos, los cuales también pueden generarse a partir de OPCs residentes en la materia gris. En este esquema, las células azules son células madre neurales y las verdes progenitores intermedios. Modificado de [3].

En el cerebro adulto existen focos de OPCs en el parénquima cerebral que originan continuamente oligodendrocitos maduros. Además, en la SVZ hay precursores neurales que se dividen continuamente y pueden dar lugar a todos los tipos neurales: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Estas células multipotentes (células tipo-B) dan lugar a intermediarios proliferativos (células tipo-C), que a su vez generan neuroblastos inmaduros (células tipo-A). Las células tipo-A rodeadas por procesos celulares de células tipo-B forman cadenas tangenciales de neuroblastos que en la zona rostral componen la vía migratoria rostral (RMS). Una vez llegan al bulbo olfativo, las células tipo-A se diferencian en interneuronas. Las células tipo-B de la SVZ además son capaces de producir OPCs que migran al cuerpo calloso, la fimbria y el estriado y son capaces de diferenciarse en oligodendrocitos maduros mielinizantes (Fig. 1 y [12]).

Es importante resaltar que actualmente no se mantiene la hipótesis de un precursor común de astrocitos y oligodendrocitos, que se había llamado O-2A o precursor restringido de glía (GRP) [13, 14]. En cambio, la visión actual es que los OPCs y los astrocitos se originan en regiones distintas del tubo neural por mecanismos independientes, como muestran por ejemplo experimentos en los que se elimina el dominio PMN de la espina dorsal: estos animales carecen de OPCs pero su población de astrocitos permanece intacta [3].

Los oligodendrocitos son las células que forman la MIELINA en el SNC. El recubrimiento de los axones con estas células es esencial para aislarlos y permitir la rápida conducción de los impulsos eléctricos. La disfunción de la mielina da lugar a graves alteraciones como por ejemplo esclerosis múltiple o leucodistrofias [15]. La vaina de mielina está formada por el citoplasma de oligodendrocitos maduros que se extiende rodeando los axones de las neuronas. El diámetro mínimo del axón para ser mielinizado y el número de vueltas a su alrededor son parámetros muy regulados [16]. Asimismo, el número de oligodendrocitos está directamente relacionado con el número y la longitud de los axones que van a ser mielinizados, eliminándose los sobrantes mediante apoptosis [17]. La vaina de mielina tiene una composición única, hidrofóbica, que permite el aislamiento de los axones. Su estructura segmentada, además, es responsable de la conducción saltatoria del impulso nervioso, que permite la rápida comunicación neuronal [16].

Las relaciones entre los oligodendrocitos y las neuronas no se limitan al recubrimiento de axones sino que son más complejas, entre las que destacan sinapsis funcionales entre precursores de oligodendrocitos e interneuronas del hipocampo [18] así como la habilidad de una subclase de precursores de oligodendrocitos (OPCs) para generar potenciales de acción [10, 19, 20].

La generación de oligodendrocitos maduros y funcionales, capaces de mielinizar un axón, pasa por varias etapas, cada una de las cuales está bien definida por su morfología y por la expresión de distintas proteínas marcadoras (Fig. 2 y [21]):

Las células que inician el linaje oligodendrogliar a partir de progenitores neurales indiferenciados son los PROGENITORES DE OLIGODENDROCITOS. Se originan en múltiples focos a lo largo del tubo neural y expresan diferentes marcadores, como nestina, PDGF- α R y plp/DM20 [16, 22, 23].

A partir de ellos se generan los PRECURSORES DE OLIGODENDROCITOS (OPCs), células con una gran capacidad migratoria que se desplazarán hasta los lugares de destino, con frecuencia muy alejados de los lugares de origen. Se trata de células con morfología bipolar y con estructuras tipo cono de crecimiento similares a los de neuronas. Expresan en su membrana gangliósidos como NG2 y A2B5 [16].

La siguiente etapa en el desarrollo de los oligodendrocitos está caracterizada por la ramificación del citoplasma. Estas células se llaman PRE-OLIGODENDROCITOS, y expresan, entre otros marcadores, el sulfátido O4 [24].

Por último, los OLIGODENDROCITOS INMADUROS expresan GalC y CNPasa y también reciben el nombre de post-migratorios pre-mielinizantes, puesto que ya han perdido su capacidad migratoria y proliferativa. Presentan un citoplasma muy ramificado [25, 26].

Los OLIGODENDROCITOS MADUROS expresan componentes típicos de la mielina, como MBP, y son capaces de crear la vaina de mielina.

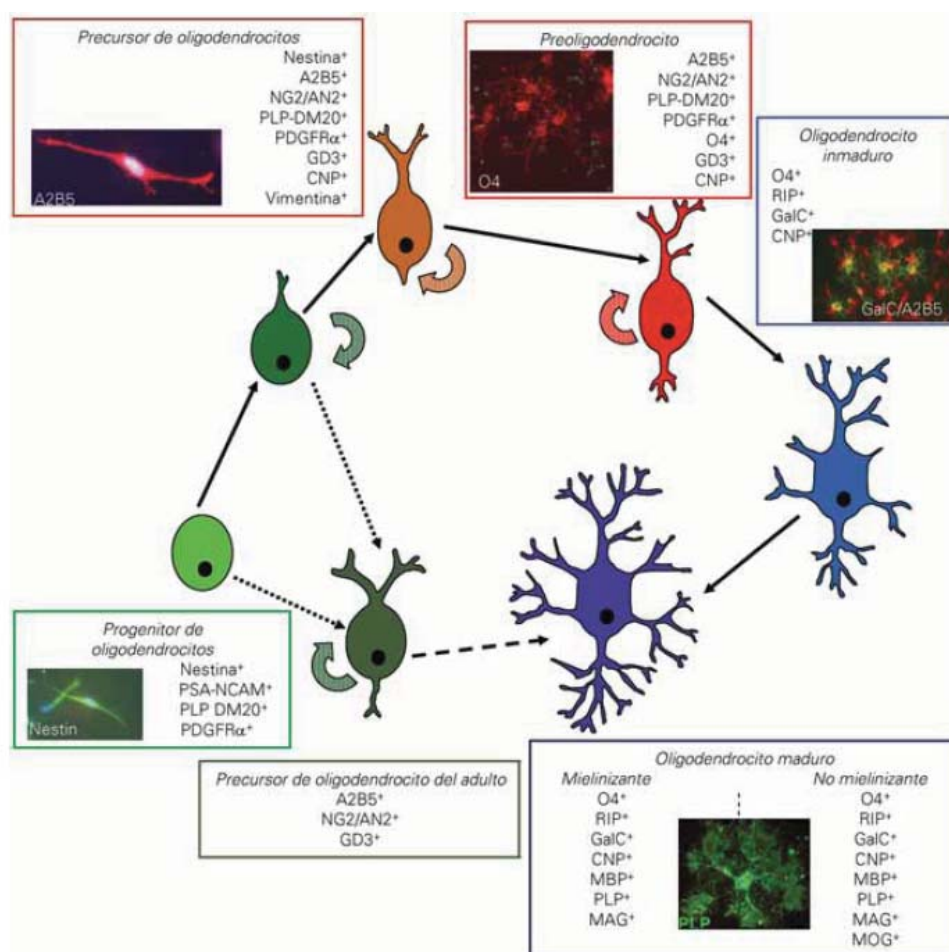


Figura 2. Esquema de las distintas etapas de maduración de los oligodendrocitos. En los cuadros se indican los marcadores expresados en cada momento. Modificado de [27].

Los oligodendrocitos son fundamentales para la mielinización, pero esta función es exclusiva de las células maduras. En cambio, también existen progenitores de oligodendrocitos durante el desarrollo y en el adulto, cuyas funciones sólo ahora empiezan a dilucidarse. Así, se ha visto que los OPCs no son simplemente un estadio de maduración hacia OLs mielinizantes, sino que se reconocen diferentes subpoblaciones de OPCs. Una de ellas (NG2⁺) participa, por ejemplo, en la

formación y estabilización de las sinapsis entre células de Purkinje y *climbing fibers* [28] y son capaces de disparar potenciales de acción [10]. Estas células también tienen un papel importante en regeneración: tras un daño en el SNC, la población de células NG2+ prolifera y da lugar a células de Schwann, oligodendrocitos y posiblemente astrocitos [29]. Recientemente se ha visto que la ablación de oligodendrocitos del cerebelo en el día 1 postnatal (P1) tiene efectos dramáticos sobre el establecimiento de los circuitos neuronales, afectando directamente a la identificación de la célula postsináptica (*axonal targeting*) y al refinamiento de las conexiones [30]. Estos resultados sugieren que el papel de los oligodendrocitos adultos como inhibidores de la regeneración y del rebrote axonal es una función más generalizada en su ontología, requerida también durante las primeras etapas postnatales para la formación de circuitos sinápticos.

2. Migración Celular

Las células neurales se originan en la zona ventricular, pero su destino final en zonas alejadas de la materia gris o blanca implica que tengan que migrar, a veces, grandes distancias. Esta migración se basa en las señales originadas en sustratos extracelulares, en factores quimioatrayentes o quimiorrepulsivos y en señales de parada. Si bien es cierto que se han identificado bastantes de estos factores, aún faltan muchos por describir [31].

2.1. Migración Neuronal

Las neuronas en el SNC utilizan dos estrategias principales para llegar a su destino: migración RADIAL y migración TANGENCIAL [32-34]. En la migración radial, las neuronas siguen una trayectoria perpendicular a la superficie ventricular y se mueven apoyándose en fibras formadas por células de la glía radial. En el caso de la migración tangencial, las neuronas se mueven en paralelo a la superficie ventricular y no requieren soporte glial.

La migración neuronal está muy bien estudiada en el caso del desarrollo de la corteza cerebral o neocórtex. Se trata de una estructura laminar organizada en seis capas, cuyo desarrollo implica la migración de las neuronas desde sus sitios de origen hasta ocupar todas las capas de una manera llamada *inside-out*: las capas más profundas se forman primero y las más superficiales son las más recientes, de modo que las neuronas más jóvenes deben sobrepasar las más antiguas para llegar a su destino.

La corteza incluye dos tipos neuronales: neuronas piramidales, originadas en la zona ventricular del *pallium*, e interneuronas, que derivan del telencéfalo ventral (MGE y CGE).

Las neuronas piramidales, glutamatérgicas, migran radialmente hasta colonizar todas las capas de la corteza. La migración radial está regulada por la glicoproteína de matriz extracelular reelina [8], que actúa controlando múltiples aspectos de la migración para asegurar la correcta laminación cortical, incluyendo cambios en el citoesqueleto y finalización de la migración [35]. Su ausencia no afecta a la neurogénesis ni a la migración neuronal inicial, pero cuando se empieza a formar la placa cortical, a E14 aproximadamente, se observa una anormal distribución de las neuronas que da lugar a malformaciones de la corteza cerebral [8]. La proteína reelina es secretada por algunas neuronas, como las células Cajal-Retzius en las zonas marginales de la corteza y células granulares del cerebelo. Actúa a través de dos receptores, el receptor tipo-1 de la apolipoproteína E (ApoER2)

y el receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDR), y en su vía de señalización es crucial la proteína *disabled 1* (Dab1), que actúa a través de las quinasas Src y Fyn [8, 36].

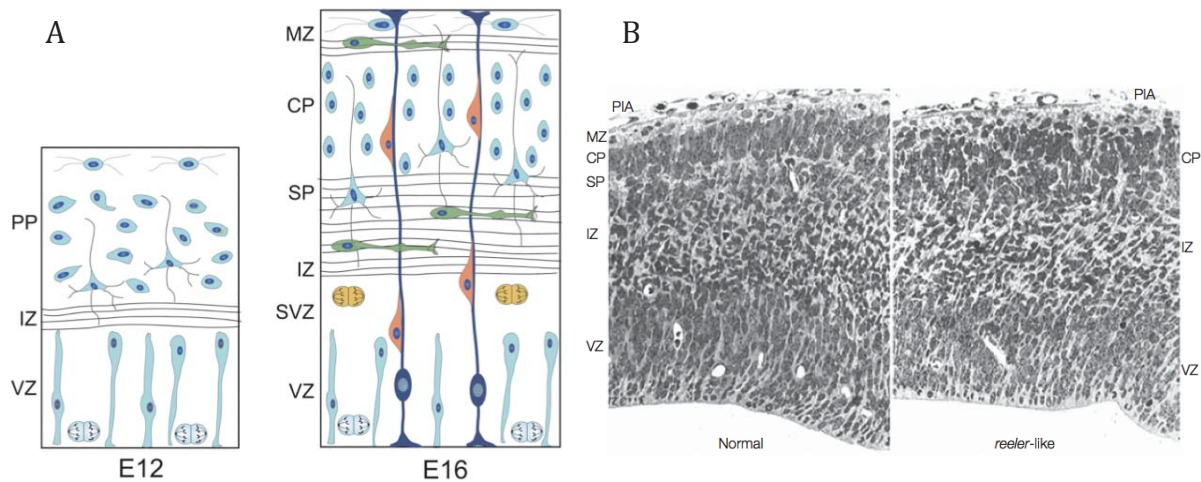


Figura 3. Desarrollo embrionario de la corteza cerebral. **A**, La zona ventricular (VZ) contiene precursores proliferativos de neuronas y glía (células azules). Los primeros precursores neuronales postmitóticos se mueven por encima de la VZ, y se asientan en una zona estrecha, la preplaca (PP). Las neuronas de la PP envían axones a células corticales y subcorticales. Los axones en crecimiento establecen la llamada zona intermedia (IZ). Después de E13, la PP se divide en la zona marginal (MZ), futura capa I, que contiene las células de Cajal-Retzius, y en la subplaca (SP), que contiene una población transitoria de neuronas. En E16, la placa cortical se engrosa debido a la llegada de interneuronas y de precursores neuronales (células naranjas), que migran a lo largo de la glía radial (células azul marino) para establecer las capas neuronales. Una gran población de interneuronas (células verdes), que suponen el 80% de la corteza murina en desarrollo, migra a la corteza desde el cerebro anterior basal siguiendo una trayectoria tangencial al plano radial. Estas neuronas migran a la corteza laminada emergente a lo largo de los axones de la IZ y MZ. La neurogénesis (células mitóticas azules y amarillas) continúa en la VZ y la zona subventricular (SVZ), que es una zona por encima de la VZ que contiene células en división que dan lugar a precursores neuronales que migran rostralmente, formando la vía de migración rostral (RMS). Modificado de [37]. **B**, Comparación del telencéfalo de un ratón normal y de un ratón deficiente en reelina (*reeler*) a E14.5. Modificado de [8]. VZ, zona ventricular; SVZ, zona subventricular; IZ, zona intermedia; SP, subplaca; CP, placa cortical; MZ, zona marginal; PIA, superficie pial; PP, preplaca.

El otro tipo neuronal que contiene la corteza, las interneuronas GABAérgicas, migra tangencialmente a través de vías definidas (una a lo largo de la zona marginal-MZ- y otra por la SVZ) hasta ocupar posiciones en todas las capas. La integración final de estas interneuronas en el circuito cortical tiene lugar no obstante mediante migración radial [32, 35]. La migración tangencial en el cerebro sigue varias rutas. Dos de las más caracterizadas son la vía migratoria rostral (RMS), que siguen las neuronas desde la SVZ hasta el bulbo olfativo, y la vía latero-cortical (LCS), que une la región cortico-estriatal con la corteza piriforme [38].

En el momento del nacimiento, la neurogénesis está prácticamente completa aunque con algunas excepciones. En ratones, por ejemplo, la SVZ sigue generando interneuronas olfativas (que por la RMS llegarán al bulbo olfativo) incluso en el adulto [31].

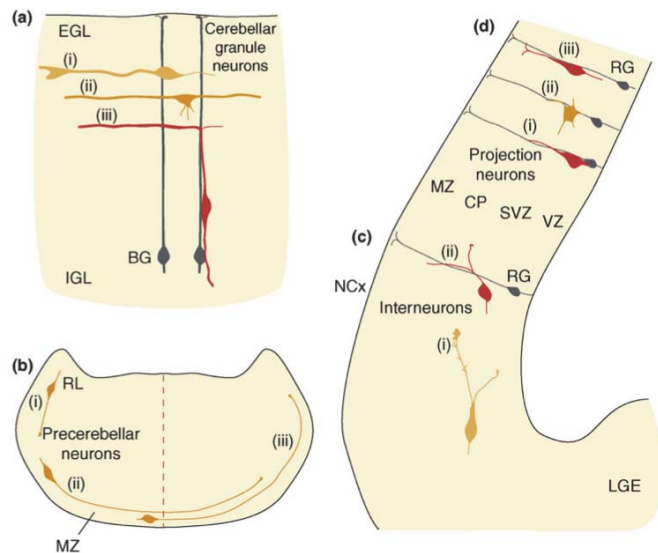


Figura 4. Ejemplos de rutas de migración neuronal. **(a)** Migración postnatal de neuronas granulares del cerebelo. Primero migran tangencialmente a través de la capa granular externa (EGL) (i); después extienden un proceso perpendicular a la superficie (ii) y se mueven radialmente hacia la capa granular interna (IGL) (iii), en contacto con la glía de Bergmann (BG). **(b)** Migración de neuronas pre-cerebelares durante el desarrollo. Las neuronas se mueven desde el labio róbico (RL) caudal a la región más superficial de la zona marginal (MZ) (i), y después viajan tangencialmente hacia la línea media (línea roja punteada) (ii). Durante la mayor parte de la migración, el soma está lejos del extremo de la prolongación o proceso (iii); éste eventualmente se convierte en el axón. **(c,d)** Migración embrionaria de neuronas corticales. **(c)** Las interneuronas migran tangencialmente desde el *subpallium* a la neocorteza (NCx) (i). Después de alcanzar su posición final en la corteza se mueven radialmente a lo largo de la glía radial (RG) hasta su correspondiente capa cortical, donde se diferencian (ii). **(d)** Las neuronas de proyección migran radialmente desde la VZ hasta la SVZ (i), donde se transforman en células multipolares (ii). Después de algunas horas reinician su movimiento hacia la placa cortical (CP) usando la glía radial como guía (iii). Modificado de [39].

A nivel celular, el proceso de migración o locomoción incluye varias etapas, comunes en distintos tipos de células. En un primer momento, la neurona se polariza mediante la aparición de procesos o prolongaciones celulares similares a los conos de crecimiento axonales, cuya función es actuar de sensores del medio extracelular y dirigir la célula según las quimiocinas encontradas. En segundo lugar, el núcleo se transloca hacia la parte más anterior, en un proceso llamado nucleokinesis. Por último, la neurona en movimiento retrae su parte posterior. Estos tres pasos sincronizados se repiten hasta que la neurona llega a su destino [32, 40, 41].

Cada una de las fases necesarias para el movimiento de la neurona está controlada por su CITOESQUELETO:

Las protrusiones que se extienden e inician el movimiento son puntos de adhesiones focales, filopodios y lamelipodios, controlados por el citoesqueleto de actina. Los microfilamentos también son responsables de la retracción de la parte posterior. Estos procesos se regulan principalmente por la actividad de la familia de proteínas RHO GTPASAS (RhoA, Cdc42, Rac1) [40, 42]. Las RhoGTPasas actúan como “interruptores moleculares”, ya que ciclan entre un estado inactivo, unido a GDP, y un estado activo, unido a GTP. Estos dos estados de actividad se regulan por proteínas activadoras de la actividad intrínseca GTPasa (GAPs), proteínas de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs), y proteínas inhibitoras de la disociación del nucleótido de guanina (GDIs) (Fig. 5). En general, RhoA regula la formación de fibras de estrés y la retracción de la parte posterior, y tiene un efecto negativo sobre la migración, mientras que Cdc42 está implicada en la formación de filopodios y Rac1 de lamelipodios [40], siendo ambas reguladores positivos de la migración. La proteína RhoA estimula la contractilidad basada en la actomiosina, lo cual contribuye al ensamblaje de fibras de estrés y adhesiones focales. Las proteínas Rac1 y Cdc42 estimulan la polimerización de actina mediante la activación indirecta del complejo de nucleación Arp2/3, a través de proteínas de la familia WASP (proteínas del síndrome Wiscott-Aldrich). El complejo de rotura de filamentos de actina ADF/cofilina también está regulado por las proteínas Rac1 y Cdc42. Múltiples vías de señalización convergen en las proteínas de la familia RhoGTPasas haciendo que su regulación sea muy compleja.

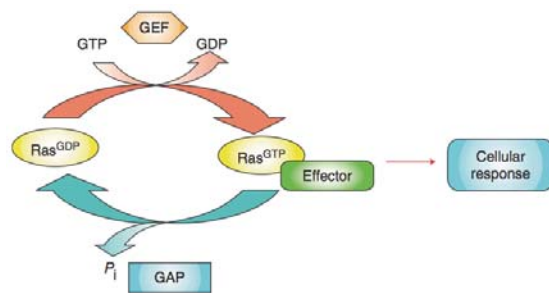


Figura 5. Ciclo de las GTPasas. En este ejemplo, Ras cicla entre un estado inactivo, unido a GDP, y un estado activo, unido a GTP. Las GEFs catalizan el intercambio de GDP a GTP, permitiendo la interacción de las GTPasas con efectores específicos que dan lugar a una respuesta celular. En cambio, las GAPs inactivan las GTPasas estimulando su actividad GTPasa intrínseca. Modificado de [43].

Los microtúbulos se concentran en los procesos iniciales y alrededor del núcleo, y son fundamentales para la nucleokinesis [32, 40], a través de proteínas como por ejemplo MAPs, DCX, Lis1, etc [32, 40]. Las proteínas MAP (proteínas asociadas a microtúbulos) actúan estabilizando los microtúbulos y su actividad depende de su estado de fosforilación, determinado por kinasas como Cdk5, JNK y la glucógeno sintasa kinasa 3 (GSK3).

La interacción entre ambos componentes del citoesqueleto (actina y tubulina) es fundamental para la coordinación de la respuesta celular a señales externas. Una de las proteínas que está en contacto tanto con los microfilamentos como con los microtúbulos es GSK3, implicada en múltiples procesos cruciales para el desarrollo del SNC, incluyendo neurogénesis, migración, polarización y guía y crecimiento axonal. Existe un *pool* de la forma inactiva de esta proteína (fosforilada en serina) en el *leading edge* de conos de crecimiento y de neuronas en migración, que colocaliza con F-actina [44]; por otro lado, uno de los sustratos de fosforilación de GSK3 es la proteína CRMP2 (proteína mediadora de la respuesta de colapso), que interacciona con e induce polimerización de tubulina y cuya fosforilación está implicada en el colapso del cono de crecimiento axonal [45]. GSK3 tiene efectos importantes en la transcripción de numerosos genes, pero también es capaz de ejercer muchas de sus funciones mediante la regulación de la actividad de varias MAPs. Así por ejemplo, durante la división asimétrica de progenitores de la glía radial, una menor actividad de GSK3 permite que se acumule la proteína nineína (de unión al extremo “-” de los microtúbulos) en una de las células hijas. Esta célula herederá el centrosoma con el centriolo original y conservará su capacidad de autorregeneración, mientras que la otra célula hija, que recibirá el centriolo nuevo, migrará fuera de la VZ y se diferenciará en neuronas [46].

2.2. Migración de Oligodendrocitos

Introducción

En el ratón, los precursores de oligodendrocitos (OPCs) se originan mayoritariamente en focos de la parte ventral del tubo neural a partir E9.5, de manera dependiente del morfógeno *Sonic Hedgehog* (Shh). La proliferación y diferenciación de los OPCs sigue un gradiente caudorrostral a lo largo del tubo neural [21, 27]. Recientemente se ha caracterizado más profundamente la colonización del cerebro anterior por parte de los OPCs, y se ha determinado que ésta tiene lugar en tres oleadas: La primera de ellas es embrionaria y tiene lugar por OPCs que expresan plp/DM20 pero no el receptor de PDGF (PDGFR α -). Estos OPCs emergen de la MGE y el área entopeduncular y se dispersan por la corteza a través de la placa cortical en desarrollo; posteriormente, sobre E11.5 en ratón, tiene lugar una segunda oleada de producción de oligodendrocitos en zonas dorsales del tubo neural, que es independiente de Shh pero dependiente de otros morfógenos como FGF, BMP y WNT [9, 47]. La segunda ola genera OPCs en zonas intermedias y dorsales, que reemplazan con el tiempo las células producidas en la primera ola hasta que la mayoría desaparecen poco después del nacimiento; en la tercera oleada, postnatal, los OPCs mantienen la expresión de plp/DM20 y

empiezan a expresar PDGFR α [48]. Migran desde la SVZ hasta colonizar la corteza cerebral [3, 5].

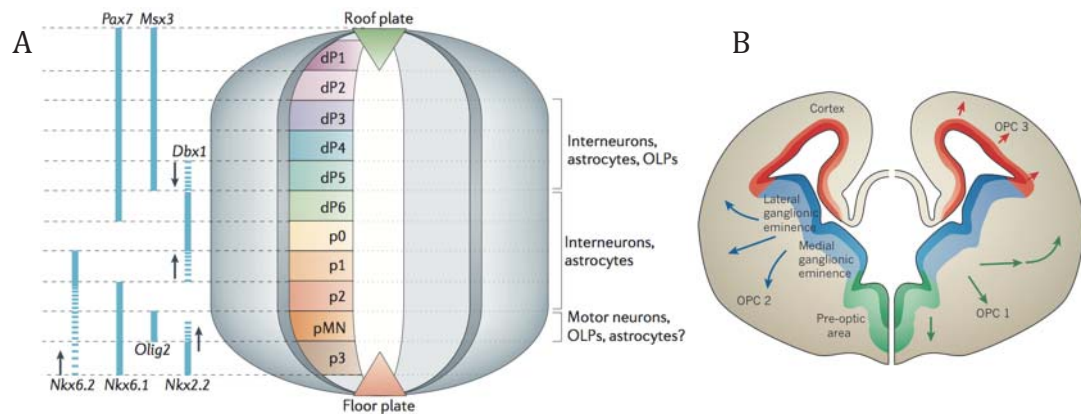


Figura 6. Generación de oligodendrocitos en la espina dorsal y oleadas de producción en el telencéfalo de ratón. **A.** Dominios de progenitores en la espina dorsal embrionaria y tipos celulares que generan. En el desarrollo, las neuronas se forman antes que la glía. En general, los OPCs se forman antes que los astrocitos y los tipos ventrales antes que los dorsales. El 85% de todos los oligodendrocitos de la espina dorsal se generan a partir del dominio pMN. Parece que el dominio pMN genera también astrocitos, aunque en menor medida. *dP1-dP6*, dominios progenitores dorsales; *Msx3*, un gen homeobox; *Olig2*, gen de linaje oligodendroglial 2; *Pax7*, gen de cajas paradas 7; *pMN* y *P0-P3*, dominios progenitores ventrales. **B.** Tres oleadas secuenciales de OPCs (OPC1, OPC2, OPC3) se generan a partir de diferentes regiones de la zona ventricular del cerebro anterior, siguiendo un gradiente temporal ventro-dorsal. Los OPC1 (flechas verdes) aparecen de precursores que expresan *Nkx2.1* en la eminencia ganglionar medial, a partir de E12.5; los OPC2 (flechas azules) se originan de precursores que expresan el gen *homeobox Gsx2* en las eminencias ganglionares lateral y medial, desde E15.5; los OPC3 (flechas rojas) se originan a partir de precursores que expresan el gen *homeobox Emx1* en la corteza, comenzando después del nacimiento. Modificado de [3, 47]

En el adulto, los oligodendrocitos se distribuyen homogéneamente por toda la sustancia blanca y también por la sustancia gris, de modo que deben migrar desde sus sitios de origen a los de destino. Cuando comienza su migración, los OPCs adoptan una morfología bipolar y aparecen estructuras similares a los conos de crecimiento de las neuronas. Los procesos intracelulares de la migración de oligodendrocitos son similares a los de neuronas, en cuanto a la regulación del citoesqueleto y las proteínas implicadas que hemos visto en la sección anterior.

Las neuronas y oligodendrocitos además comparten lugares de origen en el tubo neural [49, 50] y se desarrollan en tiempos próximos. Por tanto, no es sorprendente encontrar que moléculas que regulan la guía neuronal también están involucradas en la migración de oligodendrocitos [51].

La migración de oligodendrocitos, como la de neuronas, está mediada por dos tipos de mecanismos: mecanismos de contacto y moléculas secretables.

MECANISMOS DE CONTACTO

- Proteínas de la matriz extracelular: La *laminina* y la *fibronectina* promueven la migración de los OPCs. El bloqueo de *integrinas* inhibe la migración de OPCs neonatales de ratón [27]. Un componente de ECM muy estudiado es la *tenascina C*. Se trata de una glicoproteína muy abundante en el cerebro en desarrollo pero ausente en el cerebro adulto. Se ha visto que esta proteína inhibe la migración de OPCs de manera dependiente e independiente de procesos de adhesión [52, 53]. Además, los OPCs de nervio óptico de ratones deficientes en *tenascina C* migran más rápido [54].

- Moléculas de adhesión: La *PSA-NCAM* promueve la migración de OPCs a través de su ácido polisialílico [55]. Las *N-Cadherinas*, expresadas en la superficie de oligodendrocitos y astrocitos, promueven su adhesión al sustrato, de modo que su inhibición estimula la dispersión de OPCs .
- Moléculas de membrana: Las *efrinas* actúan regulando la migración de precursores neuronales durante el desarrollo. Los ligandos efrina B2 y B3 tienen un papel antimigratorio. La interacción entre el ligando y su receptor, además, parece jugar un papel importante en la comunicación entre OPCs y axones para modular su migración [56].
Mediante RT-PCR se ha determinado que las células del linaje oligodendroglial expresan distintos miembros de la familia de *semaforinas transmembranales*, aunque se desconoce su papel [27, 57, 58].

MOLÉCULAS SECRETABLES

- Factores de crecimiento: *FGF-2* y *PDGF* favorecen la migración de OPCs, además de su proliferación. Pueden actuar juntos o por separado [59, 60].
- Moléculas quimiotrópicas, como las *netrinas* y las *semaforinas* de clase 3. La Sema3F y la netrina 1 (Net-1) son quimioatrayentes mientras que la Sema3A actúa como quimiorrepelente para los OPCs de nervio óptico [6, 27, 57, 61, 62].

La mayor parte de los estudios de migración de oligodendrocitos se han realizado utilizando el NERVIO ÓPTICO (ON) como modelo experimental. Se trata de una extensión del SNC libre de somas neuronales, en la que sólo existen axones y células gliales, que es colonizada por OPCs extrínsecos provenientes del cerebro. En el ratón, los OPCs llegan al quiasma óptico a partir de E14.5 y, migrando por el ON, alcanzan la retina en E16.5 [21, 50].

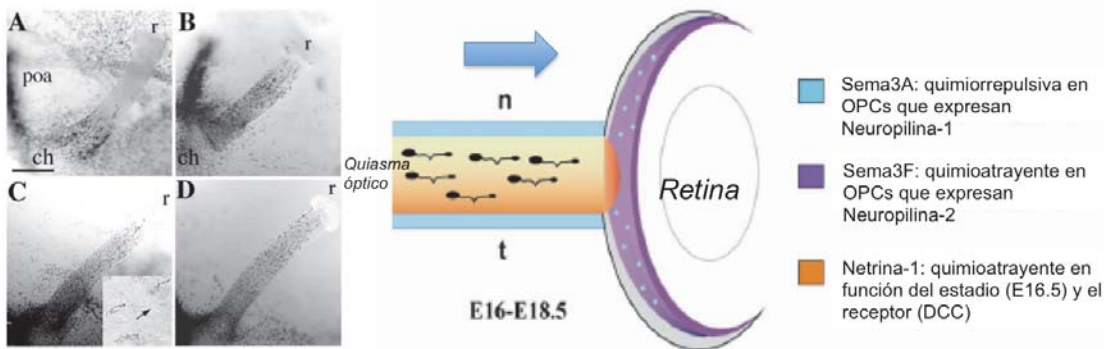


Figura 7. Distribución espaciotemporal de la colonización del ON. Los OPCs, que expresan plp, colonizan el nervio desde el quiasma hasta la retina a las edades E14.5 (A), E15.5 (B), E16.5 (C), y E17.5 (D). En el esquema de la derecha se indican tres de las señales que participan en la guía de los OPCs hasta la retina. *ch*, quiasma óptico; *poa*, área preóptica; *r*, retina; *n*, nasal; *t*, temporal. Modificado de [50] y de [9].

La migración de los OPCs en el nervio óptico está controlada por diversos factores tanto de contacto como secretables. Así, el factor de crecimiento *FGF-2* estimula la migración de los OPCs, contribuyendo a que adquieran su forma bipolar, y tiene un efecto quimioatrayente. La expresión de *Net-1* en la zona temporal del nervio ayuda a los OPCs a entrar en él desde el diencéfalo ventral. Además, también se expresa en la zona de la retina, facilitando la migración direccional de los OPCs. En la retina se expresa otra molécula atrayente, la *Sema3F*. La *Sema3A*, en cambio, tiene un

papel repelente, y su patrón de expresión alrededor del nervio indica que actúa como frontera entre el exterior y el interior del nervio, lo que fuerza a los OPCs a quedarse en su interior y migrar a lo largo de él. La expresión de la *tenascina C* en la papila del nervio actúa como señal de parada [16, 27, 50].

La respuesta a estas señales en algunos casos es diferente según se trate de OPCs de la primera ola de colonización del nervio óptico (a partir de E16) o de la segunda (a partir de E18). Así, en la primera ola, Net-1, Shh y la neuregulina 1 (Nrg1) tienen un efecto atrayente, mientras que en la segunda ola Net-1 es repelente, Shh y Nrg1 indiferentes y aparece PDGF-AA como atrayente. Parece que el papel de FGF-2 se mantiene constante mientras que todavía falta por determinar si las semaforinas secretables tienen diferentes funciones en las dos olas. Se desconoce la relevancia funcional a nivel de mielinización de la existencia de la primera ola, más alejada temporalmente de la formación de mielina [48, 63].

3. Moléculas de Guía: Semaforinas

La función del cerebro depende de un muy especializado patrón de conexiones entre poblaciones neuronales. Una vez llegan a su lugar de destino después de migrar a veces grandes distancias, las neuronas deben contactar con su objetivo correctamente, para asegurar el establecimiento de estas conexiones sinápticas adecuadamente. El proceso por el cual un axón encuentra y contacta con su célula postsináptica, que puede estar muy alejada del soma, se denomina GUÍA AXONAL [32, 64].

La zona del axón más anterior, que lidera el movimiento, se denomina CONO DE CRECIMIENTO. El cono de crecimiento es el responsable de detectar las moléculas que se encuentra la neurona a lo largo de su camino y que le indican la trayectoria que ha de seguir. Estas moléculas reciben el nombre de moléculas de guía axonal, y pueden ser difusibles o actuar por contacto. Pueden tener un papel bifuncional, actuando como atrayentes o repelentes en función del receptor que exprese el cono axonal.

Una de estas familias de moléculas guía es la familia de SEMAFORINAS. Las semaforinas se descubrieron por su capacidad de promover el colapso del cono de crecimiento axonal [65, 66], y su nombre proviene de “semaphore”, que significa transportar y converger información a través de un sistema de señalización [67]. Aunque su función se ha estudiado más profundamente en el sistema nervioso, las semaforinas se expresan en diferentes tejidos y juegan importantes papeles en el desarrollo de los sistemas cardiovascular e inmune, entre otros [67-69].

La familia de semaforinas forma parte de una superfamilia que también incluye la familia de plexinas y la familia de receptores tirosina kinasa (RTKs) MET y RON.

Las semaforinas incluyen tanto miembros secretados como asociados a membrana, y su estructura y función están conservadas a lo largo de la evolución animal. Se clasifican en 8 clases, en función de su estructura y de su secuencia primaria. Las clases 1 y 2 se encuentran en invertebrados, y la clase V en virus. El resto (clases 3-7) son específicas de vertebrados, aunque la clase 5 presenta miembros también en invertebrados. La clase 3 es secretada mientras que las clases 4, 5 y 6 son transmembranales y la clase 7 se asocia a la membrana a través de un glicosilfosfatidilinositol (GPI) [67, 70].

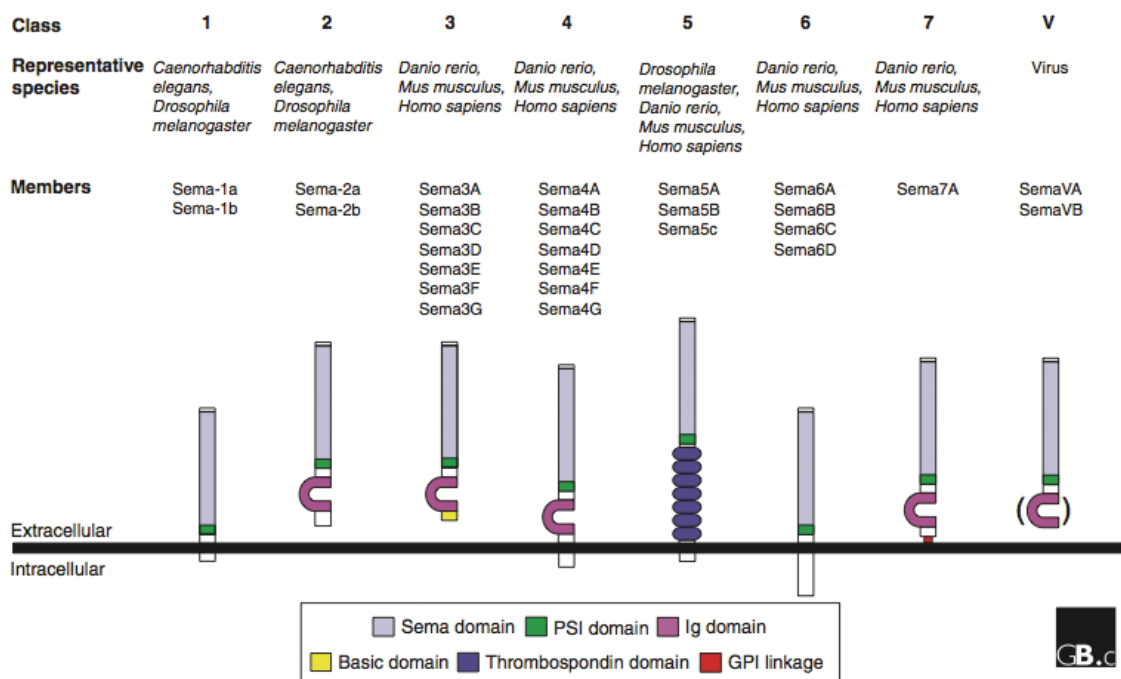


Figura 8. Esquema de la estructura primaria de los diferentes miembros de la familia de semaforinas. Todas las proteínas se muestran con su extremo amino-terminal en la parte superior. Las familias 1 y 2 se expresan en invertebrados, las 3, 4, 6 y 7 sólo en vertebrados, la 5 en ambos y la V en virus. *Sema*, semaforina; *PSI*, plexina-semaforina-integrina; *Ig*, tipo inmunoglobulina; *GPI*, glicosilfosfatidilinositol. Modificado de [67].

3.1. Estructura de las semaforinas

Todas las semaforinas presentan un dominio de aproximadamente 500 aminoácidos denominado dominio SEMA, que también está presente en los miembros de las otras dos familias que conforman la superfamilia de semaforinas. El dominio Sema incluye varios bloques de aminoácidos y residuos cisteína muy conservados que forman puentes disulfuro entre subunidades. La determinación cristalográfica de la estructura de este dominio muestra que se trata de un barril- β formado por 7 láminas, estructura similar a la presente en integrinas y receptores LDL, entre otros [67, 70]. Inmediatamente C-terminal al dominio sema, las semaforinas contienen un dominio plexina-semaforina-integrina (PSI; también conocido como MRS o CRD).

La variabilidad entre las clases de semaforinas viene dada por el resto de dominios que pueden contener. Así, las semaforinas de clases 2, 3, 4 y 7 presentan un dominio tipo inmunoglobulina, y las de clase 5 tienen siete dominios trompospondina [64] (ver figura 8).

3.2. Señalización por semaforinas

Los principales receptores de las semaforinas son las PLEXINAS, una familia homogénea de proteínas transmembranales identificadas en primer lugar por su papel en adhesión celular. Se agrupan en cuatro categorías (PlexA-D). El dominio intracelular contiene un dominio de activación GTPasa (GAP) dividido en dos por una región de unión, la cual actúa como inhibidor de la actividad catalítica [69, 71, 72]. La interacción plexina-semaforina suele estar mediada por los dominios Sema de las dos proteínas, excepto en el caso de las semaforinas de clase 3, que requieren neuropilinas (Npn) como correceptores. Además, en el caso de al menos la Sema3A, es imprescindible un tercer elemento del complejo receptor, la proteína L1 de la superfamilia de moléculas de adhesión relacionadas con inmunoglobulinas (IgSFCAM) [73].

No existe una cascada de señalización intracelular canónica, aunque, en general, la unión de la semaforina a la plexina provoca la fosforilación de ésta en su dominio citoplasmático y la activación de su dominio GAP. A partir de aquí, intervienen una gran variedad de proteínas intracelulares y de membrana, que darán lugar a diferentes efectos. Muchos de los miembros de la familia de semaforinas tienen un efecto dual (atracción y repulsión) en función de, por ejemplo, la combinación de receptores y correceptores con los que interaccionen, al igual que sucede con Net-1 y sus receptores DCC y UNC5 [74]. Esto da lugar a una gran variabilidad en las respuestas inducidas por semaforinas. Otros mecanismos por los que la señalización por semaforinas se diversifica son, por ejemplo, la dimerización entre plexinas y la interacción en *cis* de los receptores [75].

Uno de los efectos más estudiados de las semaforinas es la repulsión que ejercen sobre las neuronas, como resultado de la modificación del citoesqueleto en el cono de crecimiento de los axones. El control del crecimiento del axón o de la movilidad del cono depende de la dinámica de polimerización/ despolimerización de actina, así como de la regulación de su translocación y de la dinámica de microtúbulos. Así, la exposición a Sema3A provoca un rápido colapso del cono de

crecimiento acompañado de despolimerización de F-actina, dificultad para polimerizar nueva F-actina, disminución de la dinámica de microtúbulos y colapso de redes de microtúbulos [67].

El colapso del cono de crecimiento axonal inducido por Sema3A está muy bien caracterizado: la unión de Sema3A a su receptor PlexA1 promueve la disociación de FARP2, la cual activa la proteína Rac1. Esto favorece la asociación de Rnd1, una GTPasa pequeña, a la PlexA1. La unión Rnd1-PlexA1 libera interacciones inhibitorias dentro del dominio intracelular de la PlexA1, de modo que se activa la función GAP de dicha proteína y disminuye la cantidad de proteína R-Ras activa. Esta menor proporción de Ras activada induce la inactivación de PI3K y la consiguiente inhibición de la señalización por integrinas $\beta 1$, lo cual provoca que la célula deje de adherirse a la ECM. La inactivación de PI3K también tiene otra consecuencia, y es la inactivación de Akt y de la señalización posterior de esta vía, en la cual GSK3 juega un papel crucial. Con la vía PI3K/Akt inhibida, la proteína GSK3 β continúa activa y es capaz de fosforilar la proteína CRMP2, si previamente ha sido fosforilada por Cdk5. CRMP2 actúa regulando la dinámica de los microtúbulos. Además, la activación de Rac1 activa la vía PAK/LIMK/cofilina, que regula el citoesqueleto de actina. Por otro lado, Sema3A induce la activación de Rho/ROCK, lo que aumenta la contractilidad de actina. De este modo, la señalización por Sema3A provoca el colapso del cono de crecimiento, pero también está implicada en procesos de repulsión axonal, plasticidad sináptica y maduración de dendritas y sinapsis [43, 64, 69, 75-77].

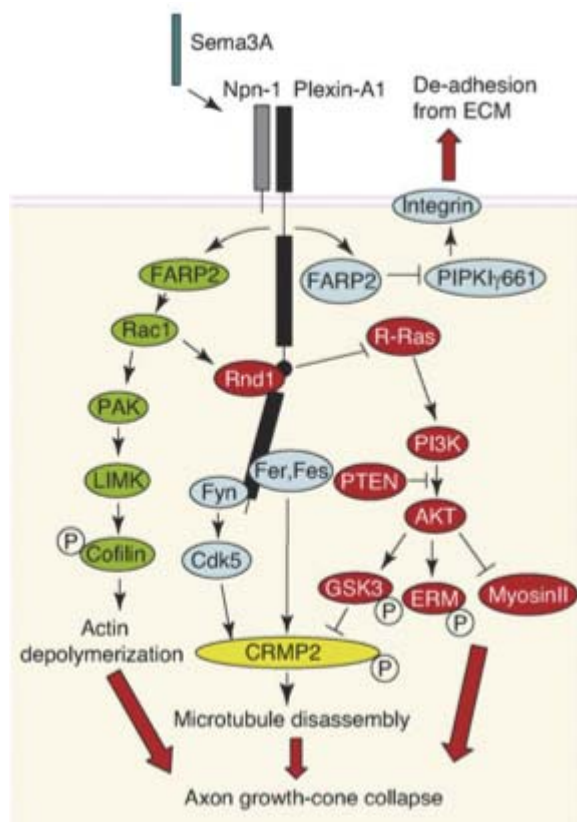


Figura 9. Componentes de la cascada de señalización de Sema3A-PlexA1. Sin ligando, R-Ras está activo, y el axón adherido a la ECM mediante integrinas. La unión de Sema3A a neuropilina 1 (Npn1) inicia la señalización por plexina. La actividad GAP de PlexA1 requiere RND1 y promueve un incremento en Ras-GDP (inactivo) que conduce a una disminución de la unión de integrinas a la ECM. Fyn se activa y estimula Cdk5. PlexA1 también media la activación de ERK/MAPK. La señalización entre PlexA1, Fes y Rac podría ser bidireccional. Fes fosforila CRMP2. Modificado de [78]

Recientemente se ha definido que la Sema3A requiere la activación de la proteína kinasa de adhesiones focales, FAK, para ejercer su efecto de colapso: el complejo receptor Plex/Npn1/L1 está unido a la proteína paxilina y ésta a FAK. La llegada de Sema3A provoca la disociación de paxilina, en un mecanismo dependiente de la fosforilación de determinados residuos de FAK. FAK fosforila también la proteína α -actinina, que actúa sobre el citoesqueleto de actina llevando a cabo las remodelaciones necesarias para producir el colapso del cono de crecimiento ([73, 79] y secciones 4 y 5 de la presente introducción).

3.3. Semaforinas transmembranales

Las semaforinas transmembranales (Semas TMB) y ancladas a la membrana son las menos estudiadas de la familia. Los miembros de las clases 1, 4, 5 y 6 son transmembranales mientras que los de la clase 7 se unen a la membrana a través de un GPI. Los receptores de las Semas TMB pueden no ser plexinas; así por ejemplo, el receptor de Sema7A es la integrina $\beta 1$, la Sema5A interactúa con proteoglicanos heparán sulfato (HSPG), y las Semas4A y 4D pueden usar Tim2 y CD72 como receptores [80-83].

Las semaforinas transmembranales presentan una gran variedad de sofisticados mecanismos de señalización que en los últimos años están empezando a dilucidarse. Así, encontramos que, además de la señalización canónica por unión a plexinas, existen casos de señalización bidireccional, interacciones en *cis* inhibitorias y proteólisis del ligando:

- La SEÑALIZACIÓN BIDIRECCIONAL se basa en la habilidad de algunas semaforinas para actuar tanto como ligando (señalización anterógrada) como receptor (señalización reversa o retrógrada). Esto se ha demostrado para la Sema1a, que puede actuar como receptor de PlexA para controlar la formación de sinapsis en *Drosophila melanogaster* [84]. Este tipo de señalización podría ser general dentro de las Semas TMB, puesto que se ha observado también para la pareja Sema6D-PlexA1 durante el desarrollo del sistema cardíaco [85].
- Recientemente se ha descubierto un nuevo tipo de INTERACCIÓN INHIBITORIA *EN CIS* para la semaforina transmembranal Sema6A y sus receptores plexina A: tanto las neuronas sensitivas de la raíz dorsal (DRG) como neuronas simpáticas expresan el receptor de Sema6A (PlexA4), pero tan sólo las neuronas simpáticas responden a ella. Esta diferencia en la respuesta se explica porque las neuronas sensitivas de DRG expresan, además del receptor, la propia Sema6A; en condiciones basales ligando y receptor de la misma célula interaccionan impidiendo que estas neuronas respondan al ligando extracelular [86].
- Sema5B, que tiene un papel de repulsión del cono de crecimiento, sufre PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO por metaloproteasas de la familia ADAM. Es interesante apuntar que el fragmento proteolizado es más potente en términos de repulsión que la proteína intacta [87].

Las Semas TMB de la clase 4 son las más numerosas [88], y participan en distintos procesos cruciales en el desarrollo y en el SN adulto. Las semaforinas de clase 4 se han visto implicadas en interacciones neurona-glía; algunos artículos apuntan a un doble papel de las células oligodendrogiales como productores y a la vez receptores de múltiples miembros de la familia de semaforinas [57, 89].

La Sema4D induce el colapso del cono de crecimiento de axones del SNC, a través de la activación del dominio RasGAP de su receptor PlexB1. La vía de señalización iniciada por Sema4D incluye la inactivación de PI3K y la activación de GSK3, que al fosforilar a CRMP2 inhibe su unión a microtúbulos y provoca el colapso del cono de crecimiento [45, 90].

Sema4D también se expresa en oligodendrocitos y se sobre-expresa después de una lesión en el SNC adulto [91]. Además, es crucial en varias etapas de la respuesta inmune: Sema4D regula las interacciones entre células inmunes T y B a través de la unión a su receptor CD72 [92, 93].

Las semaforinas de la clase 4 presentan un dominio tipo inmunoglobulina adyacente a su dominio Sema y una pequeña porción intracelular, que incluye secuencias ricas en prolina. En el caso de la Sema4F, descubierta en 1999 por Encinas y cols. [94], la parte intracelular también incluye una secuencia consenso de fosforilación por proteínas kinasa dependientes de cAMP (PKAs) o cGMP (PKGs).

El cDNA de Sema4F tiene una longitud de unas 4 Kilobases (Kb) y se localiza en el cromosoma 2 en humanos y 6 en ratón. Codifica una proteína de 776 aminoácidos (aa). La porción extracelular de la proteína provoca el colapso del cono de crecimiento de axones de células ganglionares de la retina. La expresión de Sema4F es débil en el SN embrionario pero abundante en el cerebro postnatal y adulto, así como en otros tejidos como el pulmón. Su alta expresión en el cerebro postnatal podría indicar que esta semaforina tiene un papel no tan importante durante el desarrollo sino preferencialmente en el adulto, donde podría actuar en la remodelación del SN durante el aprendizaje, el crecimiento neural tras una lesión o en el mantenimiento de circuitos neurales [94].

El dominio intracelular de la Sema4F está muy conservado, y contiene una secuencia consenso de unión a dominios PDZ, a través de la cual interacciona con los dominios PDZ de la proteína de anclaje de densidad sináptica de 95KDa (PSD-95). La interacción con PSD-95 localiza la Sema4F en la parte postsináptica de sinapsis glutamatérgicas de espinas dendríticas. Su localización sináptica se ve apoyada por su interacción con el marcador presináptico sinapsina-1 [95].

En el SNP, Sema4F participa en el mantenimiento de la interacción célula de Schwann-axón a través de la vía Ras/Raf/ERK, y su inhibición induce la proliferación de células de Schwann *in vitro*. La pérdida del contacto entre las células de Schwann y los axones que rodean induce la desdiferenciación de estas células, que comienzan a proliferar. Este proceso es muy importante para la regeneración periférica después de una lesión, pero cuando se descontrola se traduce en el desarrollo de tumores de células de Schwann, o neurofibromas. Los neurofibromas están causados por mutaciones en el gen *Nf1*, que codifica para la proteína NF-1 o neurofibrina, una RasGAP. Se ha visto que la Sema4F juega un papel crucial en estos procesos: la pérdida de NF-1 y la activación de las kinasas Ras y Raf se relacionan con una disminución de la expresión de Sema4F. La recuperación de los niveles de Sema4F en células sin NF-1 mejora la asociación de éstas con los axones [96].

4. Señalización Intracelular: FAK

4.1. Estructura de FAK

La kinasa de adhesión focal (FAK) es una proteína citoplasmática kinasa de tirosinas de peso molecular 125KDa localizada en contactos célula-ECM específicos, llamados adhesiones o contactos focales (FAs ó FCs). Se expresa ubicuamente y la letalidad a E8.5 de su delección en ratón indica un papel imprescindible de esta proteína durante la embriogénesis [97]. La proteína FAK muestra un 45% de identidad en su secuencia con la tirosina kinasa 2 rica en prolinas (Pyk2).

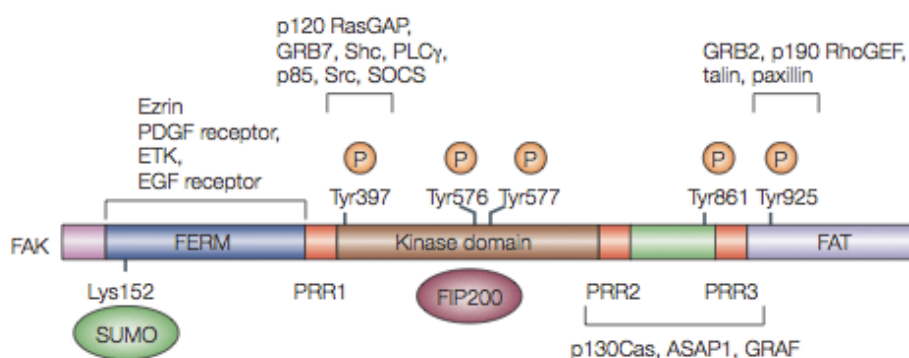


Figura 10. Estructura en dominios y sitios de fosforilación de la proteína FAK. Modificado de [98].

La estructura de FAK incluye varios dominios [98-101]:

- **FERM** (homólogo a proteína 4.1, ezrina, radixina y moesina). Es el dominio más cercano al extremo amino-terminal y está compuesto por tres lóbulos diferenciados. Media la interacción de FAK con los factores de crecimiento epidérmico (EGF) y derivado de plaquetas (PDGF). Además, a través del dominio FERM, FAK se une a integrinas y promueve la activación de otras tirosina kinasas citoplasmáticas no receptoras como ETK [102]. Proteínas adaptadoras asociadas a membrana o a actina, como la ezrina, pueden unirse al dominio FERM y facilitar la activación de FAK de manera independiente de integrinas [98]. El dominio FERM actúa como inhibidor intramolecular de FAK, mediante su interacción con el dominio catalítico de la proteína. Incluye también una secuencia de localización al núcleo (NLS) y otra de exportación (NES). En este dominio se encuentra la lisina 152, que puede ser modificada postraduccionalmente mediante la adición de un pequeño modificador relacionado con ubiquitina (SUMO) [103]. La sumoilación de este residuo favorece el transporte nuclear y una mayor actividad de la proteína [98, 104, 105].
- **Dominio catalítico**. Es el responsable de la actividad kinasa de FAK. Incluye dos tirosinas (Y576 e Y577) cuya fosforilación es necesaria para que la actividad de la proteína sea máxima (*loop* de activación). Contiene el sitio de unión de la proteína de interacción con la familia de FAK 200 (FIP200), que actúa inhibiendo la actividad catalítica de FAK [98]. Incluye una secuencia de exportación nuclear [106].
- **FAT** (localización en adhesiones focales). Es el dominio más próximo al extremo carboxi-terminal de la proteína y media la interacción indirecta de FAK con integrinas, a través de las proteínas paxilina y talina. Es por tanto responsable de la localización de FAK en las adhesiones focales. También proporciona sitios de unión a proteínas de intercambio de nucleótidos de guanosina (GEFs) como p190RhoGEF. En el dominio FAT se encuentra la

tirosina 925, cuya fosforilación crea un sitio de unión para la proteína adaptadora Grb2 [98, 104].

FAK contiene tres regiones ricas en prolina (PRR1-3), que actúan como sitios de unión de proteínas que contienen dominios de homología 3 a Src (dominios SH3). Algunas de estas proteínas son p130Cas (implicada en la activación de Rac en lamelipodios) y GRAF y ASAF-1 (relacionadas con el citoesqueleto de actina y la formación de adhesiones focales) [104, 107].

Entre el dominio FERM y el dominio catalítico se encuentra un residuo fundamental para la actividad de FAK, la tirosina 397.

Existe una forma proteolítica de FAK, llamada FRNK (no-kinasa relacionada con FAK), que incluye la parte más carboxi-terminal de la proteína (dominios PRR2, PRR3 y FAT). Este fragmento pesa unos 41KDa y carece de actividad catalítica. FRNK, que se expresa *in vivo*, actúa como dominante negativo de FAK, antagonizando algunas de sus funciones [100, 108].

4.2. Activación y mecanismos de señalización de FAK

Un prerequisite para la activación de FAK es su colocación con integrinas en FAs.

FAK puede ser activada por diversas señales, que incluyen factores de crecimiento, estímulos mecánicos, ésteres de forbol y GPCRs. El primer paso en la activación de FAK es la autofosforilación de la tirosina 397, que puede ocurrir bien en *cis* o en *trans*. Para que se produzca la autofosforilación, previamente se debe haber liberado la interacción inhibitoria del dominio FERM de la proteína con el dominio catalítico [109].

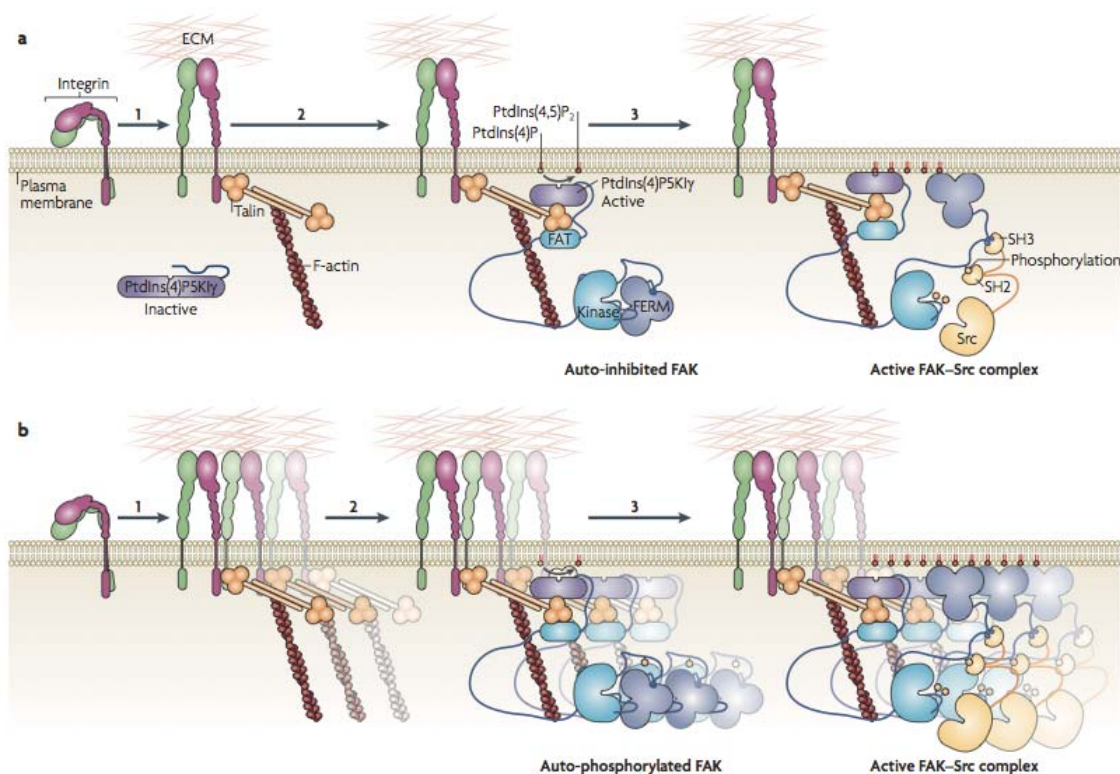


Figura 11. Modelos actuales de activación de FAK por integrinas. **A**, Modelo 1: En el estado inactivo, FAK adopta una conformación cerrada, autoinhibida, mediante interacciones entre sus dominios FERM y kinasa. La kinasa fosfatidilinositol-4-fosfato 5-kinasa tipo 1-γ (PtdIns(4)P5K1γ) también se mantiene en un estado autoinhibido por su extremo carboxi-terminal. Las interacciones de integrinas con la ECM inducen la formación de adhesiones focales reclutando proteínas de adhesión focal como talina, FAK y PtdIns(4)P5K1γ. La talina estabiliza la unión de integrinas al citoesqueleto de actina (paso 1). PtdIns(4)P5K1γ interacciona con

la talina a través de su parte Cterminal, que libera su autoinhibición (paso 2). La generación de concentraciones localmente elevadas de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, activa el dominio FERM de FAK, induciendo su secuencia de activación: separación de la interacción autoinhibidora de FERM, autofosforilación de Y397, unión de Src y fosforilación de Y576 e Y577 (paso 3). **B**, Modelo 2: La unión de integrinas a la ECM provoca la activación y oligomerización de integrinas (paso 1). Las integrinas asociadas causan la unión de moléculas intracelulares de adhesiones focales, incluyendo FAK y $\text{PtdIns}(4)\text{P5KI}\gamma$, y la oligomerización de FAK promueve su trans-autofosforilación (paso 2). La autoinhibición puede entonces terminarse por varios estímulos, como la interacción de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ con el dominio FERM, o por la interacción de los dominios SH2 y SH3 de Src con el dominio FERM de FAK. Modificado de [109].

El residuo **PY397** ahora actúa como un sitio de unión de proteínas que contienen dominios SH2. Las proteínas que se unen a FAK a través de este motivo incluyen kinasas de la familia Src (SFKs), fosfolipasa C- γ (PLC γ), supresor de señalización por citokinas (SOCS), proteína 7 unida a receptor de factor de crecimiento (Grb7), proteína adaptadora de Shc (p120RasGAP) y la subunidad p85 de la kinasa de inositol-3-fosfato (PI3K).

Src se une a PY397 creando un complejo FAK-Src activo que fosforila los residuos **Y576** e **Y577**, del *loop* de activación, para obtener la máxima actividad catalítica de FAK. Src puede fosforilar otros residuos de FAK, como la tirosina **861**, lo cual estimula la unión de p130Cas a las PRRs y su posterior fosforilación. Esto permite la unión de Crk a p130Cas, que activa Rac. El resultado es la formación de lamelipodios y la migración celular.

El complejo FAK-Src también puede fosforilar **Y925**, en el dominio FAT, generando así un sitio SH2 de unión para la proteína adaptadora Grb2. La unión de Grb2 inicia la vía de señalización de Ras/ERK2/MAPK, que influye en proliferación y supervivencia celular, así como en la dinámica de los contactos focales. Los sitios de unión de paxilina y de Grb2 en el dominio FAT solapan, de modo que son mutuamente excluyentes. Cuando Y925 se fosforila, se une Grb2 y esto desplaza a paxilina, separándose FAK de la adhesión focal. Además, ERK2 activada por Grb2 fosforila un residuo en FAK (**S910**) que disminuye la afinidad de FAK por los contactos focales [98] y actúa como inhibidor de la proteína [110].

FAK sumoilado se encuentra enriquecido en el núcleo. Una vez allí, puede actuar favoreciendo la ubiquitinación y posterior degradación de la proteína p53, promoviendo de esta manera la supervivencia y proliferación de la célula. En este caso FAK actúa no como kinasa sino como proteína de anclaje para la ubiquitina E3 ligasa Mdm2, que interacciona con el dominio FERM [111].

Existe un mecanismo de señalización de FAK muy interesante, que consiste en la translocación de un fragmento proteolizado de la proteína (generalmente de la parte amino-terminal) al núcleo celular. Allí puede desempeñar funciones de regulación génica [112, 113].

Como muestran estos ejemplos, FAK presenta una notable diversificación en su señalización intracelular, lo cual explica las numerosas y variadas funciones en las que participa. Además, hay que tener en cuenta que, si bien es una proteína kinasa, en la mayoría de los casos su función se consigue como proteína de anclaje o andamio, que sirve de soporte de interacción para otras muchas proteínas.

4.3. Procesamiento postranscripcional de FAK

El gen que codifica para FAK se denomina *ptk2a* mientras que el que codifica para el otro miembro de la familia, Pyk2, se llama *ptk2b*. Ambos se localizan en el cromosoma 8 en humanos y comparten un ancestro común [114]. FAK está conservado en vertebrados e invertebrados; el dominio más conservado es el dominio kinasa, seguido del dominio FERM. El gen en ratón tiene 140Kb, y en humanos 230Kb, con al menos 40 y 44 exones, respectivamente. Existen múltiples RNAs mensajeros (mRNAs) producto del *splicing* alternativo que tiene lugar en este gen, y que dan lugar a varias isoformas de FAK según la combinación de exones (13, 14, 16 y 31) que tenga lugar. Estos exones codifican para pequeñas inserciones, llamadas CAJAS, de 28, 6, 7 ó 3 aminoácidos [114-117]. Las cajas de 28, 6 y 7 aa se encuentran alrededor del residuo Y397, mientras que la inserción de 3 aa está en el dominio FAT. Además, existe una serie de secuencias variables en la zona no traducida 5'UTR (cajas A, B, C, D, y E) [114, 118].

Las cajas 3 y 7 se expresan en cerebro y en testículo, mientras que las cajas 6 y 28 sólo se encuentran en cerebro. La expresión de la caja 28 es relativamente baja en todas las áreas cerebrales, pero las cajas 6 y 7 se expresan a niveles parecidos aunque con distinto patrón: La caja 7 se expresa de manera difusa en todas las regiones cerebrales, y la caja 6 se encuentra muy enriquecida en hipocampo y corteza cerebral. Los análisis de expresión de FAK apuntan a que la isoforma más común en cerebro es la que contiene las cajas 3, 6 y 7. La presencia prácticamente exclusiva de las isoformas de FAK en el cerebro y su gran nivel de conservación evolutiva apuntan a un papel específico de la proteína en el SN [114, 116, 117].

A nivel funcional, la presencia de las cajas 6 ó 7 provocan un aumento de los niveles de autofosforilación en la tirosina 397 de FAK, el primer evento en su activación. Parece que la presencia de estos péptidos pequeños a ambos lados del residuo Y397 promueve que la reacción de autofosforilación pase de ser intermolecular a ser intramolecular, lo cual aumenta su eficiencia [119]. Este efecto es aditivo para estas dos cajas, pero no para las inserciones de 3 ó 28 aa, que no influyen en la autofosforilación. Aunque la caja de 3 aa está en el dominio FAT, no influye en la localización de FAK a las adhesiones focales [115-117]. En cambio, la isoforma con las cajas 6 y 7 interacciona más intensamente con Src a través de su dominio SH2 pero menos a través de sus dominios SH3 [120]. La caja 28 incluye una secuencia homóloga invertida de unión a calmodulina-CaMKII (comunicación personal del Dr. Burgaya).

Las combinaciones de exones más comunes dan lugar a las siguientes isoformas de FAK:

- FAK⁰: Isoforma canónica o sin cajas. Se encuentra en la mayoría de los tejidos.
- FAK⁺: Isoforma que contiene la inserción de 3 aminoácidos (PWR). Se encuentra muy enriquecida en cerebro y en testículos.
- FAK^{+,6,7}: además de la inserción PWR, contiene las cajas 6 y 7. Muy enriquecida en cerebro.
- FAK^{+,6,7,28} o FAK^{all}: Presenta todas las cajas (3, 6, 7 y 28). Muy enriquecida en cerebro.

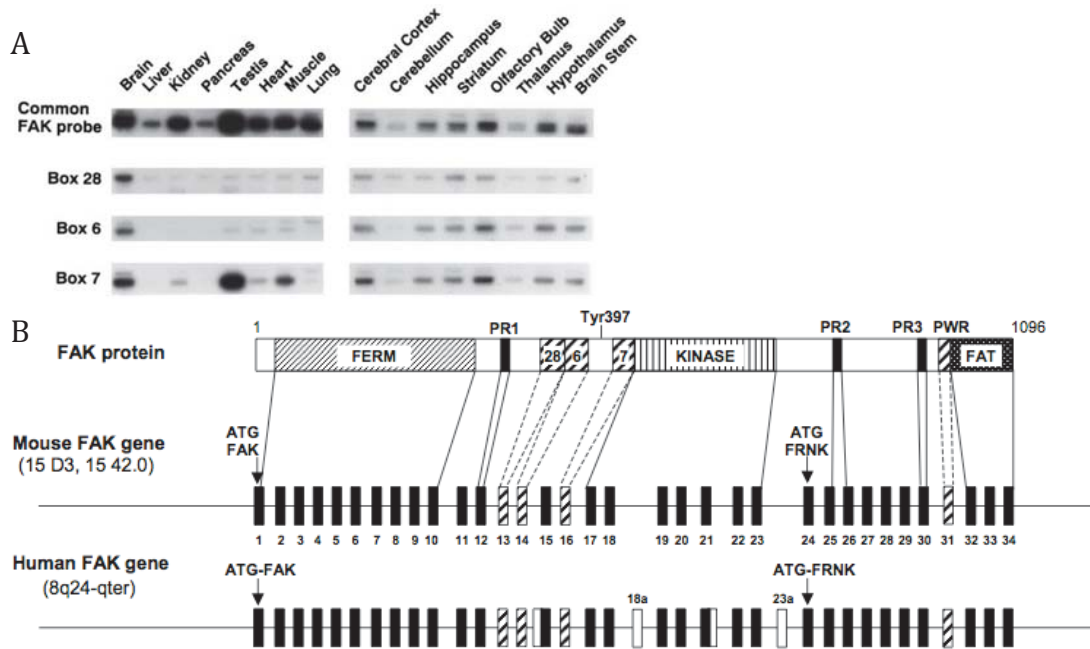


Figura 12. Organización y procesamiento postranscripcional del gen de FAK, *ptk2*. **A**, El análisis de la expresión de las distintas cajas mediante RT-PCR e hibridación con oligonucleótidos específicos muestra la presencia preferencial de las isoformas de FAK en sistema nervioso. Modificado de [116]. **B**, Comparación de las secuencias codificantes de los genes murino y humano de FAK. Las cajas negras indican exones conservados y las ralladas exones alternativos. Las cajas de 6, 7 y 28 aminoácidos se encuentran alrededor del residuo de autofosforilación mientras que la caja de 3 aa (PWR) está en el dominio C-ter. Las flechas indican el codón ATG de iniciación de la traducción del fragmento FRNK. Los exones 18 y 23 son exclusivos de primates. Modificado de [114].

4.4. Adhesiones focales

Las adhesiones o contactos focales (FAs ó FCs) son lugares de interacción entre la ECM, integrinas y el citoesqueleto celular. Se trata de grupos dinámicos de proteínas estructurales y regulatorias que transducen señales externas al interior celular. Los FCs median procesos de adhesión y de migración [98]. FAK tiene un papel fundamental en su formación, pero también en su desensamblaje, como muestran el excesivo número de FCs y la menor capacidad de migración de fibroblastos que carecen de FAK [121]. Así, el papel de FAK es promover el recambio de los FCs. FAK se localiza en estos contactos focales gracias a su dominio FAT. A través de este dominio, FAK interacciona con la proteína paxilina, que junto con la proteína talina son las responsables de la unión a integrinas. Existen muchas otras proteínas presentes en los contactos focales, como por ejemplo:

- Src: se activa por unión al dominio SH2 creado en FAK después de su autofosforilación. Una vez activa, fosforila diversos componentes de los contactos focales como FAK, p130Cas y paxilina.
- p130Cas: Es una molécula de anclaje clave, que se localiza en las adhesiones focales gracias a su interacción con FAK via su dominio SH3. Su fosforilación es necesaria para su asociación con otras moléculas señalizadoras.
- α -actinina: es una proteína del citoesqueleto de actina que funciona manteniendo la unión entre los contactos focales y las fibras de estrés. Interacciona con vinculina y es fosforilada por FAK en su residuo Y12, lo cual resulta en una disminución de su afinidad por actina.

Otras proteínas, como ERK2 y calpaína, pueden aparecer transitoriamente en estos complejos [98, 107].

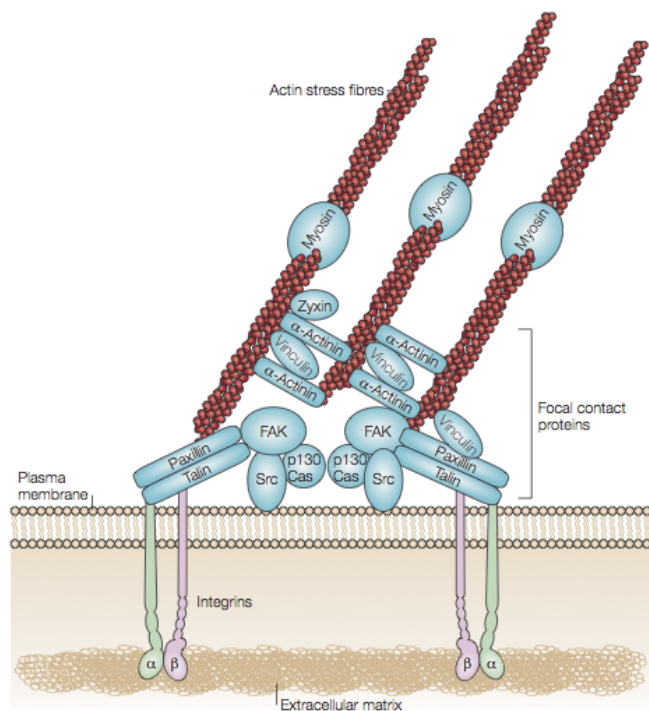


Figura 13. Esquema de la interacción de la ECM y la célula a través de los macrocomplejos proteicos llamados contactos focales. Modificado de [98].

Los FCs son estructuras dinámicas, siempre cambiantes, lo que dificulta su comprensión. Al contrario de lo que pueda parecer, son fundamentales en la migración celular: para que ésta ocurra, la célula debe en primer lugar extender una protrusión y hacer un contacto inicial con la ECM. Algunos de estos contactos iniciales, dependientes de Rac, evolucionan a adhesiones focales dependientes de Rho, que estabilizan la célula durante su migración [107]. FAK está muy relacionado con estas pequeñas GTPasas y por tanto con el citoesqueleto de actina: el complejo FAK-Src puede provocar la activación de las vías Ras-ERK2 y Rac-JNK, lo cual promueve la migración celular. La relación de FAK con Ras es compleja, puesto que por otro lado Ras fosforilada activa la vía Cdc42/PAK1/MEK/ERK que induce la fosforilación de FAK en un residuo que actúa inhibiendo la proteína, la S910 [110, 122]. PY397-FAK activa la proteína RhoA, que promueve la formación de fibras de estrés, y fosforila N-WASP (que ha de estar previamente activado por Cdc42), una proteína activadora del complejo de nucleación de actina Arp2/3. Las proteínas activadora de Rho, p190RhoGEF, e inhibidora, p190RhoGAP, también pueden localizarse en adhesiones focales [98, 105].

FAK también regula el citoesqueleto de microtúbulos: al residuo PY925 de FAK se unen Grb2 y dinamina, creando un complejo necesario para el desensamblaje de las adhesiones focales [105]. Por otro lado, la fosforilación por Cdk5 de la serina 732 de FAK hace que colocalice con γ -tubulina en el centro organizador de microtúbulos (MTOC) de la región perinuclear de la célula, y es esencial para el correcto movimiento del núcleo durante la migración [123].

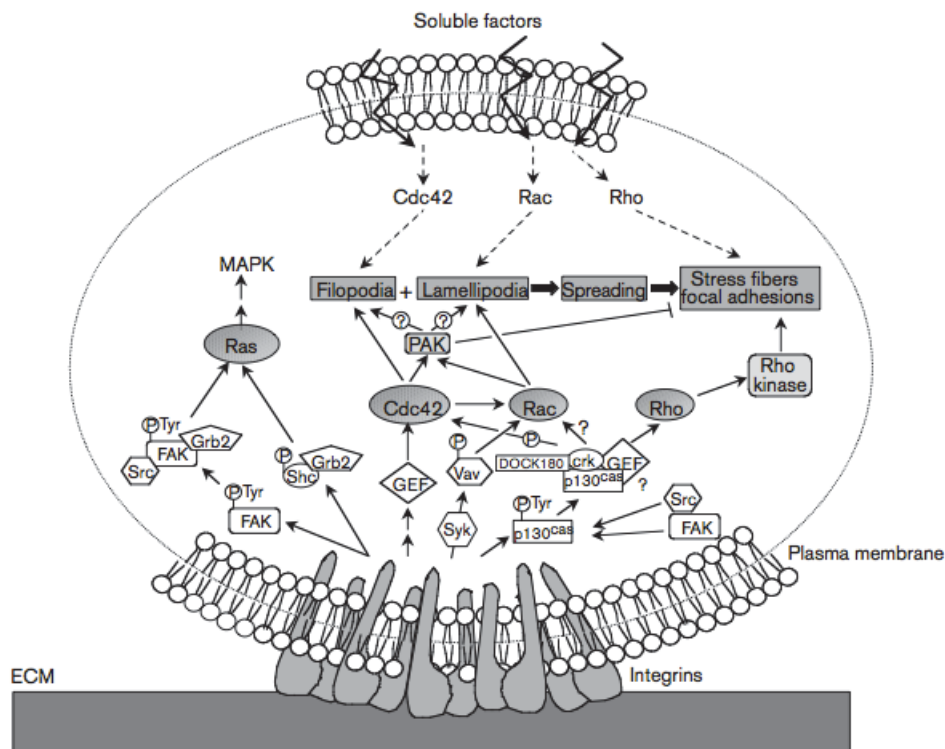


Figura 14. La adhesión mediada por integrinas activa la familia de proteínas RhoGTPasas. La interacción de la célula con fibronectina conduce a la activación de Cdc42 y Rac, las cuales activan múltiples proteínas como la kinasa PAK, que está implicada en el desensamblaje de fibras de estrés. Rho se activa por factores solubles y, más débilmente, también por unión de integrinas, dando lugar a la formación de fibras de estrés y FAs. Modificado de [42].

5. Funciones de FAK en SN

5.1. El cono de crecimiento y la guía axonal

La guía de los axones durante su desarrollo, para asegurar que contacten en su lugar correcto, está mediada por una estructura denominada CONO DE CRECIMIENTO AXONAL. El cono de crecimiento es una estructura móvil, altamente especializada, localizada en la parte final de una neurita [124]. A nivel funcional, está compuesto por dos compartimentos: periférico y central. El compartimento periférico (P) es la zona más externa y está enriquecido en actina en forma de fibras ramificadas (lamelipodios) y haces paralelos (filopodios); el compartimento central (C) se sitúa justo detrás del periférico y está enriquecido en mitocondrias, vesículas, y una matriz de microtúbulos que se extiende desde la base del axón. Además, se ha descrito la existencia un tercer compartimento de transición (T) que incluiría estructuras contráctiles de actomiosina [125]. De acuerdo a su localización periférica, el citoesqueleto de actina es fundamental para decidir el camino a seguir en respuesta a señales extrínsecas, mientras que los microtúbulos son los bloques que conforman el axón y por tanto su extensión requiere del ensamblaje de microtúbulos [124].

Las proteínas de la familia RhoGTPasa regulan el citoesqueleto de actina y por tanto son cruciales en el crecimiento del axón. Otras proteínas de interacción con actina, y que tienen un papel importante en el cono de crecimiento, son los complejos de nucleación Arp2/3 y WASP y la proteína desestabilizadora de filamentos ADF/cofilina.

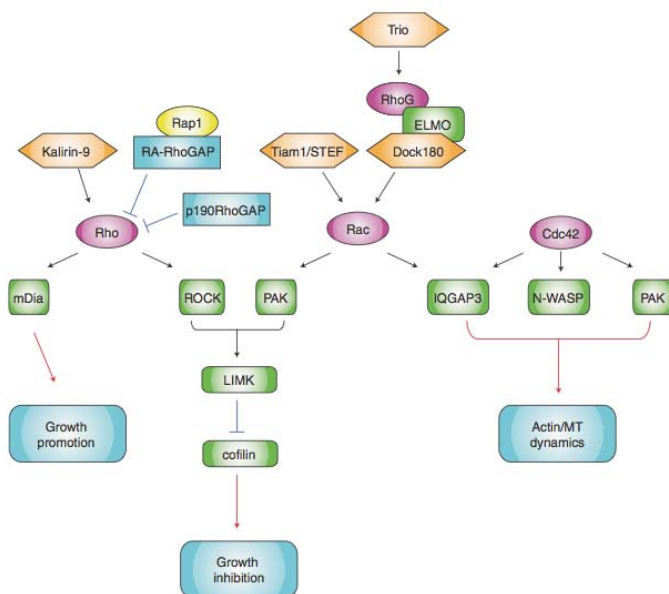


Figura 15. RhoGTPasas en crecimiento axonal. Rho puede promover o inhibir la extensión del axón según el tipo de efector (mDia o ROCK, respectivamente). RA-RhoGEF inactivan Rho para promover crecimiento axonal. Por otro lado, el dominio RhoGEF de kalirina-9 activa Rho para promover crecimiento axonal. Tanto ROCK como PAK pueden inhibir el factor de despolimerización de actina cofilina vía LIMK. El balance entre cofilina desfosforilada (activa) y fosforilada (inactiva) parece ser crucial para la extensión del axón. Varias GEFs (naranja), como Tiam1, STEF y Dock180 pueden actuar por encima de Rac para regular la dinámica de actina y tubulina. Cdc42 también puede controlar la dinámica del citoesqueleto a través de sus efectores IQGAP3, PAK y N-WASP. Modificado de [43].

En el sistema nervioso en desarrollo, los conos de crecimiento no forman contactos focales genuinos sino puntos de contacto más pequeños similares a los encontrados en células con gran movilidad [126]. En cultivos primarios, FAK se localiza en FCs, mientras que en neuronas maduras se encuentra en el citoplasma y muy enriquecida en los conos de crecimiento [115]. Como hemos visto anteriormente, FAK es un mediador crucial en eventos que requieren remodelación del citoesqueleto, y recientemente se ha descrito que es responsable de la nucleación de actina y la formación de filopodios en neuronas, eventos necesarios para el crecimiento del cono axonal [127]. Así, la ausencia de FAK provoca que los axones crezcan más lentamente de lo habitual [126], y además altera la morfología del cono de crecimiento, disminuyendo el número y el volumen de

filopodios respecto del control, y la dinámica del citoesqueleto de actina, con una menor cantidad de F-actina en el compartimento P del cono. FAK promueve la nucleación de actina en el cono de crecimiento mediante la fosforilación de N-WASP [127].

El cono de crecimiento contiene múltiples receptores que son los responsables de detectar las señales del exterior, las cuáles indican a la neurona dónde debe dirigirse. Los cambios en el citoesqueleto que hemos visto anteriormente son provocados por las moléculas de guía axonal, que pueden ser secretables o de ECM. Existe una limitada variedad de moléculas de guía, pero según los receptores y maquinaria intracelular expresados por la neurona pueden iniciar múltiples cascadas de señalización. La integración a nivel molecular de todas estas señales se desconoce, pero un candidato con cada vez más pruebas a su favor es FAK [128]. En los últimos años, se ha demostrado que FAK se encuentra por debajo de la señalización de varias de estas moléculas guía:

- BDNF (provoca atracción) [129].
- Laminina (provoca atracción) [129].
- Slit/Robo (provocan repulsión) [129].
- Sema3A (provoca repulsión) [73, 79].
- Netrina 1 (puede provocar atracción y repulsión) [130-133].
- EfrinaA1 (provoca atracción sólo sobre laminina, no sobre poli-D-lisina) [134].

La mayoría de estas señales actúan modificando el citoesqueleto de actina mediante la regulación de la actividad de proteínas GEF (activadoras) y GAP (inhibidoras), que a su vez regulan la actividad de proteínas RhoGTPasas. Así por ejemplo, *BDNF* actúa activando FAK para producir atracción del cono de crecimiento. El complejo FAK-Src fosforila FAK en el residuo Y861, lugar de unión de p130Cas. Ésta activa una RacGEF que da lugar a la activación de Rac1, que promueve la formación de lamelipodios. Por otro lado, p130Cas activa la proteína Cdc42 en la periferia del cono axonal. Cdc42 puede inducir la formación de filopodios, vía PAK, o de lamelipodios, vía N-WASP- Arp2/3 [129, 135]. Además de en la formación de lamelipodios y filopodios, BDNF actúa promoviendo el recambio de los FCs mediante la fosforilación de FAK en el residuo Y925, que desplaza la proteína de su interacción con paxilina y por tanto de las adhesiones focales [135].

Slit2, que es una molécula de repulsión, actúa inhibiendo la fosforilación de FAK tanto en Y397 como en Y861. Slit2 también inhibe la actividad de Src mediante la fosforilación de su residuo Y529, que tiene un efecto inhibitor. Esto repercute en una menor actividad de Cdc42 en el cono de crecimiento [129].

Como hemos visto anteriormente, la semaforina difusible *Sema3A* provoca el colapso del cono de crecimiento axonal [73, 79]. Esta función es dependiente de la actividad de FAK, como muestra el hecho de que en ausencia de FAK, *Sema3A* no es capaz de provocar el colapso del cono de crecimiento. Así, *Sema3A*, que se une a sus receptores Plex-A/Nrp1/L1, promueve un patrón único de fosforilaciones (Y397, Y576, Y577 e Y925) y desfosforilaciones (Y407, Y861) en FAK, que conducen al desensamblaje de las adhesiones focales y a la retracción del cono axonal. También es necesaria la función catalítica de FAK, puesto que se ha visto que fosforila α -actinina como parte de este mecanismo de retracción [79].

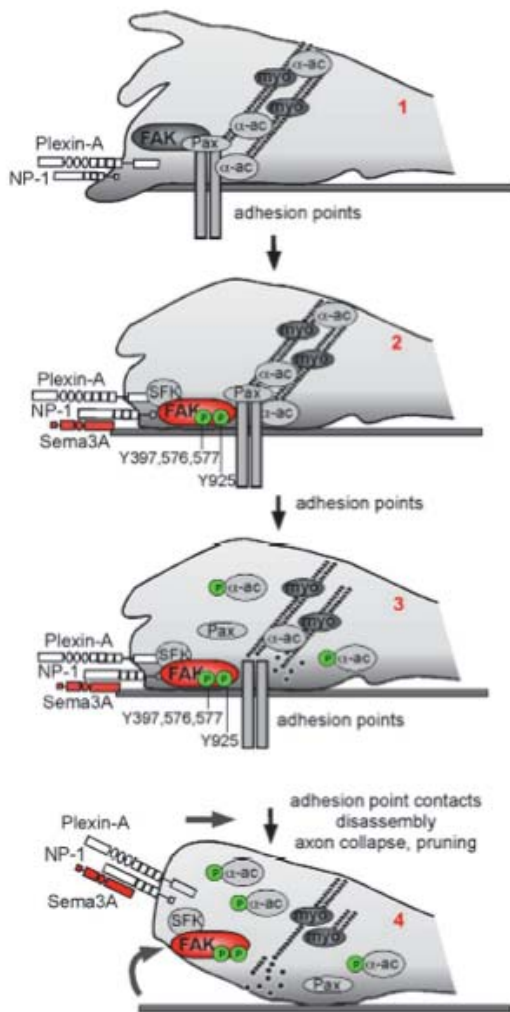


Figura 16. Modelo de funcionamiento de FAK en el colapso axonal mediado por Sema3A. (1) FAK se localiza en puntos de adhesión que contienen paxilina, promoviendo la estabilización de los contactos focales. (2) La activación de Sema3A-Npn1-PlexA recluta FAK e induce la fosforilación en las tirosinas Y397, Y576, Y577 e Y925. (3) La activación de la kinasa FAK resulta en la fosforilación de α -actinina, lo que promueve la separación de las fibras de actina. La fosforilación de FAK en Y925 conduce a la disociación de paxilina y FAK en los puntos de contacto. (4) El desensamblaje del citoesqueleto de actina y los puntos de adhesión promueve el colapso del cono de crecimiento y la retracción axonal. α -ac, α -actinina; *myo*, miosina; *NP-1*, neuropilina-1; *Pax*, paxilina; *SFK*, kinasas de la familia Src. Modificado de [79]

Las *netrinas* son una familia muy conservada de proteínas secretables, estructuralmente relacionadas con la laminina. Funcionan en guía axonal y morfogénesis de tejidos, entre otros, y sus receptores en el contexto de guía son DCC (delecionado en cáncer colorrectal) y UNC5 [133, 136]. Las netrinas pueden funcionar tanto en un contexto de atracción como de repulsión en función del receptor al que se unan y de la maquinaria intracelular activada. De este modo, la atracción es exclusivamente mediada por la unión de netrina a DCC, mientras que la repulsión puede ser mediada por unión sólo a UNC5 o a heterodímeros de UNC5 y DCC [131, 132, 136]. Una serie de estudios han demostrado que los efectos de Net-1 en guía axonal son mediados por FAK [130-132]: FAK interacciona directamente con DCC y, en respuesta a Net-1, es fosforilada en varios residuos (Y397, Y577 e Y861). La activación de FAK y Src son eventos requeridos para la función de Net-1. FAK, por lo tanto, aparece como el nexo de unión entre netrina y proteínas de la vía de señalización de DCC, como PI3K, ERK/MAPK y RhoGTPasas [130]. Recientemente, se ha determinado que el cono de crecimiento es capaz de ejercer fuerzas de tracción sobre Net-1 unida a la ECM. Estas fuerzas mecánicas son capaces de provocar la activación de FAK, presumiblemente por la liberación de la interacción autoinhibitoria del dominio FERM con el dominio catalítico. Este resultado aboga por que los efectos de Net-1 se deben a un gradiente de esta proteína unida a la ECM, y no en forma soluble, y a la activación mecánica de FAK [133].

5.2. Ramificación axonal y plasticidad sináptica

Los axones no sólo siguen un preciso camino a través del medio extracelular, sino que además se ramifican en posiciones determinadas para inervar múltiples y a veces lejanas dianas [137]. En muchas áreas del SNC, como la corteza y la médula espinal, la inervación de las neuronas postsinápticas tiene lugar mediante ramificación del axón en vez de por extensión del cono de crecimiento primario. De este modo, la RAMIFICACIÓN AXONAL es un mecanismo importante en la guía axonal. De hecho, hay cada vez más datos que indican que las moléculas de guía axonal también participan en la ramificación del axón [138]. Varias moléculas como semaforinas, factores neurotróficos y efrinas regulan la ramificación axonal y la formación de sinapsis [126]. Así, la Sema3A, cuyo papel como promotor del colapso del cono de crecimiento es de sobra conocido, inhibe la ramificación axonal mediante la despolimerización de F-actina, la disminución de la dinámica de microtúbulos y el colapso de redes de microtúbulos en el cono de crecimiento. Net-1, que actúa atrayendo el cono de crecimiento, promueve la ramificación, aunque en este caso no afecta al cono de crecimiento sino que induce la formación de ramas *de novo* desde el tronco dendrítico mediante la rápida acumulación de filamentos de actina en filopodios. Ninguna de las dos afecta a la longitud axonal [139].

El control de la formación y retracción de ramas axonales es necesario para establecer el patrón final de conexiones. Se ha visto que FAK se encuentra regulando distintos procesos orientados al establecimiento de los circuitos neuronales, gracias a su posición central entre el exterior celular y el citoesqueleto. Así, mediante la generación de un ratón mutante condicional para *ptk2* se ha comprobado que en neuronas que carecen de FAK hay un incremento en el número de terminales axonales (que da lugar a un mayor número de sinapsis) así como en el número de ramas axonales. La exuberante arborización axonal observada se debe a un incremento en los puntos de ramificación pero también a una disminución en la retracción de las ramas axonales. Por lo tanto, parece que FAK actúa como un regulador negativo de la ramificación axonal así como de la formación de sinapsis, y lo hace, al menos en parte, mediante la regulación de la familia de RhoGTPasas a través de la activación de p190RhoGEF [126]. Otros datos sugieren un papel positivo de FAK en el crecimiento neurítico (ver Discusión y [140]), de modo que parece que FAK puede ejercer diferentes efectos.

Estas funciones de FAK durante el desarrollo parece que también ocurren en el SN adulto. De este modo, FAK parece necesario para permitir a las neuronas reorganizar su árbol axonal y sus sinapsis durante la reorganización sináptica que tiene lugar en el aprendizaje [141, 142].

Las neurotrofinas son otra familia de proteínas que regula la formación de ramas axonales. En esta vía de señalización juega un papel crucial la proteína kinasa asociada a Cdc42, Ack1 (resultados no publicados del laboratorio, La Torre, Masdeu y cols., 2012). Ack1 es, como FAK, una proteína tirosina kinasa citoplasmática no receptora, de 125KDa, que contiene cuatro dominios principales: un dominio catalítico, un dominio SH3, un dominio de unión a Cdc42 y una gran región rica en prolinas, que ocupa aproximadamente el 50% de la proteína. La proteína Ack1 se encuentra muy enriquecida en cerebro adulto, expresándose en altos niveles en hipocampo, corteza, hipotálamo, tálamo y cerebelo [143]. También se expresa en el SN en desarrollo, especialmente en áreas de proliferación y en vías de migración [144].

Varios datos apoyan una posible interacción de FAK y Ack1:

1. FAK es un componente central de macrocomplejos proteicos de adhesión celular [98]. Se ha visto que Ack1 interacciona con varias de las moléculas integrantes de estos complejos: vinculina, talina, p130Cas y Src [145, 146]. Además, Ack1 puede regular la dinámica del citoesqueleto de actina a través de su interacción con WASP [146].
2. Ack1 se une específicamente a Cdc42 activa (Cdc42-GTP) [145], que como hemos visto se encuentra regulada por FAK [129].
3. FAK tiene un papel crucial en migración neuronal, y Ack1 participa en procesos de migración de varios tipos celulares [147, 148]. De hecho, Ack1 forma parte de la vía de señalización de integrinas- β 1, que regula procesos como migración y adhesión celular [149]. La oligomerización de integrinas es el principal mecanismo activador de FAK.
4. Tanto FAK como Ack1 son proteínas citoplasmáticas tirosina kinasa no receptoras. Las dos incluyen secuencias ricas en prolina y se activan mediante autofosforilación en tirosina (Y397 en FAK, Y284 en Ack1) [149].
5. Ack1 se encuentra en la vía de señalización de neurotrofinas que induce la ramificación neurítica (datos no publicados de La Torre y Masdeu, 2012). Por su parte, FAK responde a diversos factores de crecimiento neuríticos (NGF [150], BDNF [151]) y se ha descrito que juega un papel crucial como inhibidor de la ramificación axonal [79, 126].

Con todos estos datos razonamos que, muy posiblemente, FAK y Ack1 se encuentran en la vía de señalización que regula la ramificación neuronal.

Otra vía relacionada con neuritogénesis en la que participa FAK es la vía de señalización de la molécula de adhesión celular neural NCAM, proteína que actúa en funciones tan diversas como migración celular, crecimiento neurítico y fasciculación, sinaptogénesis y plasticidad sináptica [152]. El crecimiento neurítico dependiente de NCAM requiere la activación de Fyn, una tirosina kinasa que activa FAK. Esta activación depende de la interacción de la molécula de unión a calcio calmodulina con NCAM. El mecanismo de señalización en este caso implica la translocación al núcleo del fragmento amino-terminal de FAK y de un fragmento de NCAM que contiene el dominio transmembrana y la parte carboxi-terminal de la proteína [153].

Otros estudios apuntan a un papel crucial de FAK en procesos de PLASTICIDAD SINÁPTICA en el cerebro adulto. Las sinapsis son la unidad de información fundamental en el SN. Son uniones asimétricas entre neuronas compuestas de un compartimento presináptico y otro postsináptico, que tienen funciones diferentes: el compartimento o botón presináptico facilita la rápida liberación de los neurotransmisores químicos en respuesta a impulsos eléctricos, mientras que el compartimento postsináptico recibe estas señales químicas y las transforma en potenciales de acción que permiten su propagación. La habilidad de las sinapsis de cambiar su fuerza sináptica basada en la información recibida por otras neuronas se llama plasticidad sináptica, y es la base de funciones cerebrales cruciales como el aprendizaje y la memoria [154].

Las ESPINAS DENDRÍTICAS son pequeñas protrusiones en la superficie de las dendritas que reciben la mayoría de las sinapsis excitatorias. Cambios en su morfología han sido implicados en plasticidad sináptica y en memoria a largo plazo [142]. Las espinas están formadas por actina: durante el desarrollo temprano postnatal aparecen las protrusiones dendríticas como filopodios finos, largos y muy móviles. Según avanza el desarrollo, algunos filopodios dendríticos maduran y se transforman en espinas con forma de seta [155]. Los reguladores del citoesqueleto de actina, por tanto, juegan un papel crucial en la formación de estas estructuras. Así, la fosforilación de FAK en Y397 inducida por la unión del ligando de efrina al receptor EphB2 inicia una vía de señalización en la que están implicadas RhoA, ROCK y LIMK1, la cual fosforila la proteína cofilina en el residuo de serina S3. Cofilina es una proteína de rotura de F-actina, que favorece el reciclaje y la dinámica del

citoesqueleto de actina contribuyendo por tanto a la movilidad celular. La fosforilación en S3 la inactiva, de modo que se estabiliza el citoesqueleto de actina, lo cual contribuye a mantener el fenotipo maduro (forma de seta) de las espinas dendríticas. Así, la ausencia de FAK correlaciona con un mayor número de espinas inmaduras (tipo filopodios) [156].

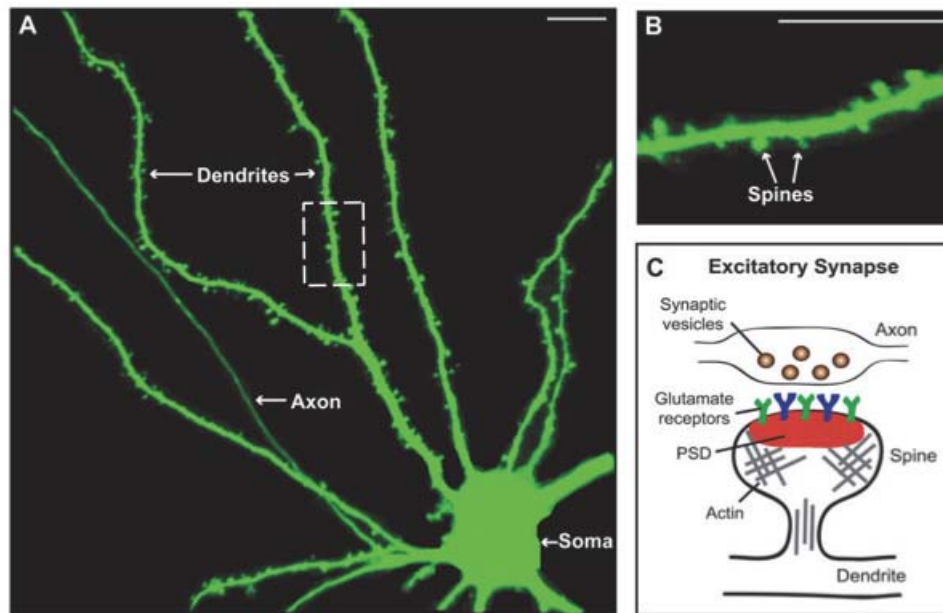


Figura 17. Las espinas dendríticas son los sitios primarios de sinapsis excitatorias en el cerebro. **A**, Neurona de hipocampo de rata que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). Se aprecia el soma, el axón y las dendritas ramificadas que contienen espinas dendríticas. **B**, Ampliación del rectángulo marcado en A, que permite un mejor observación de las espinas. **C**, Esquema de una sinapsis excitatoria, que se forma entre una espina dendrítica y el botón presináptico de un axón. La densidad postsináptica (PSD) se localiza en la cabeza de la espina, y contiene receptores de glutamato, proteínas de anclaje y otras moléculas de señalización. Las espinas están enriquecidas en filamentos de actina. Barra de escala: 10 μ m. Modificado de [155]

6. FAK en Oligodendrocitos

Como hemos visto, muchas de las moléculas implicadas en guía axonal y migración neuronal actúan a través de FAK. De este modo, se ha visto que FAK actúa también regulando diversas funciones en oligodendrocitos [50, 51]:

MIGRACIÓN El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) tiene diversas funciones en el desarrollo del SN, incluida la migración neuronal [157]. El tratamiento de OPCs con VEGF no afecta ni a su proliferación ni a su diferenciación, pero en cambio sí induce su migración a través del receptor de VEGF, Flk1. El mecanismo implica la asociación de FAK con paxilina, lo cual reorganiza el citoesqueleto de actina promoviendo que el OPC migre [158].

Otro factor de crecimiento implicado en la migración de oligodendrocitos es el derivado de plaquetas, PDGF [21, 27]. El mecanismo por el cual PDGF induce la migración de OPCs incluye la activación de la kinasa Fyn, la cual activa Cdk5 que fosforila WAVE2. WAVE2 es una proteína de la familia WASP que actúa a través de Rac para controlar la formación de lamelipodios [159]. Aunque en este trabajo no se describía la participación de FAK, es de esperar que module alguno de los pasos, debido a su conocida relación con Cdk5 y Rac.

La netrina 1 es fundamental para la correcta formación del bulbo olfativo (OB). En un ratón deficiente en Net-1 se ha visto que esta proteína regula la migración de neuronas y oligodendrocitos por la vía de migración rostral (RMS) [6]. Como hemos visto anteriormente, FAK se encuentra por debajo de la señalización de Net-1, mediando sus efectos en guía axonal, por lo que no sería extraño comprobar que también participa en este aspecto.

RAMIFICACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y MIELINIZACIÓN El primer evento en la mielinización consiste en la extensión de múltiples procesos ramificados que testan el ambiente para localizar axones adecuados. El lamelipodio elaborado por una prolongación oligodendroglial ha sido comparado con el cono de crecimiento axonal de las neuronas. Así, se ha visto que un gran número de proteínas de señalización intracelular de la vía que regula la guía axonal por netrina 1, por ejemplo, están implicadas también en los procesos oligodendrogiales requeridos para la mielinización. En ambos casos, la reorganización del citoesqueleto de actina requiere la activación de SFKs, de N-WASP y de RhoGTPasas [160]. Concretamente, la unión de Net-1 a DCC recluta Fyn a un complejo que incluye también FAK, como ha sido descrito para neuronas [130, 132]. La activación de Fyn inhibe RhoA, lo cual provoca un incremento en la extensión de prolongaciones oligodendrogiales. En cambio, y a diferencia de lo que ocurre en neuronas, la adición de Net-1 no tiene ningún efecto sobre Cdc42 ni Rac1 [160, 161].

El efecto de FAK en la diferenciación de oligodendrocitos y en mielinización parece ser muy dependiente de la ECM, y por tanto de integrinas. FAK es capaz de inhibir la expansión de las ramificaciones celulares en presencia de fibronectina pero promueve la maduración de oligodendrocitos en presencia de laminina [162]. En presencia de laminina, Fyn fosforila FAK en tirosinas (Y397, Y576), lo que activa Rac1 y Cdc42, y se produce un incremento en el crecimiento de procesos oligodendrocíticos [163]. Estudios en ratones *knock-out* condicionales de FAK muestran que FAK promueve la mielinización en el momento adecuado en el nervio óptico, actuando como integrador de la señal iniciada por la interacción oligodendrocito-ECM. FAK actúa promoviendo el crecimiento de procesos durante las fases iniciales de la mielinización [164]. Otro tipo de ratón deficiente en FAK muestra el mismo efecto que ratones que expresan una forma dominante negativa de la $\beta 1$ -integrina: los oligodendrocitos mielinizantes requieren un diámetro de axón mayor para comenzar la mielinización [165].

OBJETIVOS

1. Estudiar el papel de la semaforina transmembranal Sema4F y la kinasa de adhesión focal FAK en el desarrollo de oligodendrocitos:
 - a. Análisis de la expresión de Sema4F en SN en desarrollo y adulto.
 - b. Estudio de las funciones de Sema4F en precursores de oligodendrocitos.
 - c. Estudio del papel de FAK como transductor de la señal de Sema4F.
2. Estudiar las isoformas de FAK:
 - a. Descripción de la expresión de las isoformas de FAK en varias áreas del cerebro.
 - b. Análisis de las isoformas de FAK en distintos tipos celulares del SN.
3. Estudiar la relación entre FAK y Ack1:
 - a. Caracterización de la interacción entre FAK y Ack1.
 - b. Estudio del papel de FAK y Ack1 en ramificación axonal: caracterización bioquímica y funcional.
 - c. Análisis de la respuesta a Net-1 de Ack1.
 - d. Análisis por MS de las proteínas que interaccionan con FAK y Ack1 y de su estado de fosforilación en distintos paradigmas de actividad cerebral.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1:

Expresión de Sema4F en neuronas y oligodendrocitos del cerebro y regulación de la migración de precursores de oligodendrocitos en el nervio óptico.

1.1. Análisis de la expresión del transcrito de Sema4F en el cerebro de ratón durante el desarrollo.

Para determinar el patrón de expresión de Sema4F en el cerebro de ratón, primero estudiamos su distribución mediante la técnica de hibridación *in situ* (ISH). Usamos una sonda de RNA de 1.6Kb que codifica para la región extracelular de la Sema4F de rata (Sema4Fe). Esta sonda es homóloga en un 97% a la secuencia de ratón [94] (Fig. 1.1) y se denominó *W_c* por ser éste el nombre inicial dado a la Sema4F [166]. Los resultados indican que los transcritos de Sema4F se expresan ampliamente en la mayoría de regiones cerebrales durante el desarrollo a partir de E14 (Figs. 1.1A y M). El marcaje es especialmente intenso a E16-P0 (Figs. 1.1B, D, E, G, H y L). La expresión se mantiene elevada durante el desarrollo postnatal (Figs. 1.1N y O), y significativa en el adulto, aunque es claramente menor (Figs. 1.1C, F, I, J, K, y P). El cerebelo aparece muy marcado a edades postnatales (Fig. 1.1O) y en el adulto, principalmente en la capa granular (Fig. 1.1P). Además, usando el RNA total del cerebro llevamos a cabo un ensayo Northern Blot (NB) para detectar la expresión de Sema4F. Como se ve en la Fig. 1.2A obtuvimos un único transcrito expresado a distintas edades, especialmente abundante a P0.

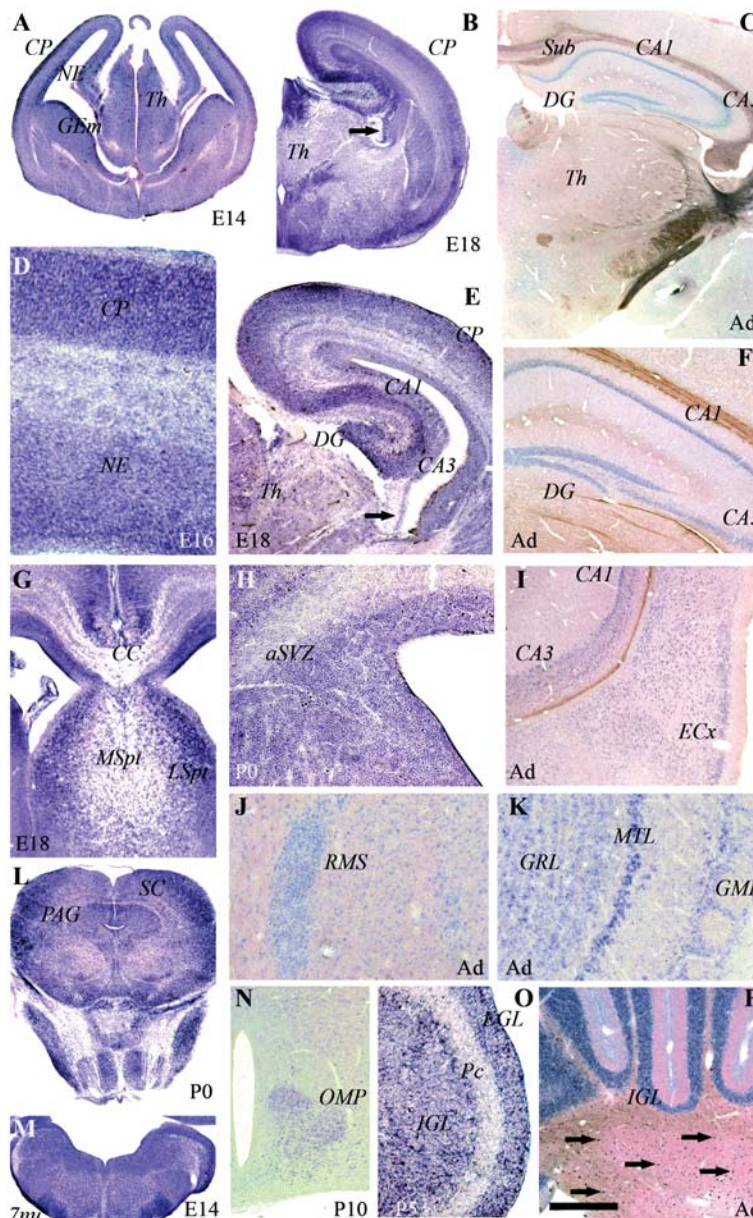


Figura 1.1: Distribución mediante ISH del transcrito Sema4F durante el desarrollo. **A-C**, vistas panorámicas del cerebro anterior a distintas edades. La flecha en B apunta a la vía de migración de OPCs de la fimbria. **D**, placa cortical y neuroepitelio de un embrión E16. **E-F**, vista del hipocampo a diferentes edades. La flecha en E apunta a la vía de migración de OPCs de la fimbria. **G**, septo y cuerpo calloso a E18. **H**, zona subventricular anterior a P0. **I**, corteza entorrinal adulta. **J**, vía migratoria rostral en el cerebro anterior adulto. **K**, vista parcial del bulbo olfativo adulto. **L**, mesencéfalo, mostrando el área gris periacueductal y la formación reticular pontina. **M**, cerebro posterior a E14. **N**, Hipotálamo ventromedial. **O,P**, cerebelo a P5 y edad adulta. *aSVZ*, zona subventricular anterior; *CA1* y *CA3*, capas piramidales del hipocampo; *CC*, cuerpo calloso; *CP*, placa cortical; *DG*, giro dentado; *ECx*, corteza entorrinal; *EGL*, capa granular externa del cerebelo; *GEm*, eminencia ganglionar; *GML*, capa glomerular del bulbo olfativo; *GRL*, capa granular del bulbo olfativo; *IGL*, capa granular interna del cerebelo; *LSpt*, septo lateral; *MSpt*, septo medial; *MTL*, capa mitral del bulbo olfativo; *NE*, neuroepitelio;

PAG, área gris periacueductal; *Pc*, célula de Purkinje; *SC*, colículo superior; *Sub*, subiculum; *St*, estriado caudado/putamen; y *Th*, tálamo. Las flechas indican la fimbria y la vía de migración de OPCs del hipocampo en B y E, y apuntan a células de núcleos cerebelares profundos en P. Escala de las barras: 500 μm en A-C y L, 250 μm en E, F, I, M, N y P, 200 μm en G, H, J, K y O, y 100 μm en D y K.

En edades embrionarias, la expresión del RNA mensajero (mRNA) de *Sema4F* es especialmente alta en las capas proliferativas (eminencia ganglionar en E14, Fig. 1.1A, neuroepitelio a E16, Fig. 1.1D) así como en la zona subventricular anterior (aSVZ) en edades postnatales tempranas (Fig. 1.1H). A edades postnatales, las células precursoras de la aSVZ migran a través del RMS, teñido en el adulto (Fig. 1.1J), hasta el bulbo olfativo (Fig. 1.1K), que también en el adulto muestra muchas células marcadas. La mayoría de las neuronas jóvenes postmitóticas también expresan el transcrito de *Sema4F* (placa cortical, Figs. 1.1A y D; células piramidales y granulares tempranas del hipocampo, Fig. 1.1E).

En el cerebro adulto, la *Sema4F* se expresa en muchas poblaciones neuronales (ver resumen en Tabla 1.I). Además de en neuronas, los transcritos de esta proteína se expresan en células que parecen células gliales (flechas en Figs. 1.1B y E; ver también Fig. 1.5). Por ejemplo, las flechas de las figuras 1B y E apuntan a la vía de migración de OPCs (OMP) del hipocampo. Además, el cuerpo calloso, que carece de neuronas, aparece claramente marcado a P0 (Fig. 1.1G, ver también Fig. 1.5).

El marcaje con la sonda W_e indica que el transcrito de *Sema4F* se expresa ampliamente en precursores neurales, células gliales y neuronas postmitóticas en el cerebro en desarrollo y adulto.

	E14	E16	E18	P0	P5	P10	P15	P21	Adult
<i>Telencephalon</i>									
Olfactory bulb									
Glomerular layer		++	++	++	++	++	++	++	++
Mitral layer		++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Granular layer		++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Neocortex</i>									
Marginal zone		-/+	-/+	-/+					
Cortical plate	++++	++++	+++	+++					
Subplate	++	++	++	++					
Corpus callosum			++	++	+	+	+	+	+
Cingulate/retrosplenial					+++	+++	+++	++	++
High layers (II/III)					++	++	++	+	+
Deep layers (V/VI)					++	++	++	+	+
Piriform cortex			++	++	++	++	++	++	++
Entorhinal cortex			++	++	++	++	++	++	++
Subventricular zone/RMN			++	++	++	+	+/-	+/-	+/-
<i>Hippocampus</i>	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	++
CA1, CA2, CA3			++++	+++	+++	+++	+++	++	++
Dentate gyrus			+++	++	++	+++	++	++	++
Hilus						+++	++	++	++
Interneurons						++	+	-/+	-/+
Alveus/fimbria			++	+		-	-	-	-
<i>Basal forebrain</i>									
Ganglionic eminence	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+
Caudate/putamen			++	++	+	+	+	+	+
G. pallidus/N. accumbens	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Medial septum/diagonal band			++	++	++	++	++	++	++
Dorso-lateral septum			+++	+	+	+	+	+	+
Preoptic area	++								
Amygdaloid complex		+++	++	++	++	-/+	-/+	-/+	-/+
<i>Diencephalon</i>									
Epithalamus/habenula/SCO	++	+++	++++	+++	+++	++	++	++	++
Thalamus	+++	+++							
Dorso-lateral nuclei			++	+++	++	++	++	+	+
Medial nuclei			+	+++	+	++	+	+	++
Ventral nuclei			+	+++	+	++	+	+	+
<i>Hypothalamus</i>		++							
Dorso-lateral nuclei			++	++	+	+	+	+	+
Medial nuclei			++	++	+	+	+	+	+
Ventral nuclei			+++	++	++	++	++	+	+
<i>Mesencephalon</i>									
Superior colliculus	+	+	++	++	+	+	+	+	+
Inferior colliculus	+	+	++	++	+	+	+	+	+
Periaqueductal gray area	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++
Raphe	++	++	+	+	+	+	+	+	+
Red nucleus	++	++	++	+					
Tegmental area			+++	++	++	++	++	++	++
Geniculate area			+++	+++	++	++	++	++	++
Pontine nuclei, reticular	+			+++					
<i>Hindbrain</i>									
<i>Cerebellum</i>									
Rhombic lip	+++		++++	+++	+++	+++	-/+	-	-
External germinal layer			+++	++	++	++	+	+	+
Purkinje layer			+++	++	+++	+++	+++	++	++
Granular layer					+++	+++	+++	++	++
<i>Brainstem</i>	++	++	++	+	+	+	+	+	+
Olivary nuclei	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+

Tabla 1.I. Expresión de Sema4F en el cerebro de ratón a lo largo del desarrollo. Se encontraron desde niveles de expresión muy bajos (-/+) y bajos (+) hasta muy altos (++++) en distintas regiones. (-) significa que no se detectó expresión, y la ausencia de símbolo significa que no se estudió la zona indicada en ese momento del desarrollo.

1.2. Distribución de la proteína Sema4F en el cerebro en desarrollo.

Para estudiar la distribución de Sema4F se desarrolló un antisuero de conejo contra un péptido de la parte extracelular distal del dominio Sema (residuos 567 a 587 de la Sema4F murina, [94]). Purificamos la fracción IgG, que nombramos anti-4F, y la usamos para estudios de inmunocitoquímica.

Previamente, se testó la especificidad del anti-4F en células COS1 transfectadas con un vector de expresión que contiene la versión total de la Sema4F unida a Myc (Fig. 1.2B). El “Western Blot” (WB) de lisados celulares de estas células transfectadas muestra unas bandas que no aparecen en células transfectadas con otras semaforinas transmembranales (Fig. 1.2C). Finalmente, comprobamos que nuestro suero anti-4F es capaz de inmunoprecipitar la proteína Sema4F (Fig. 1.2D).

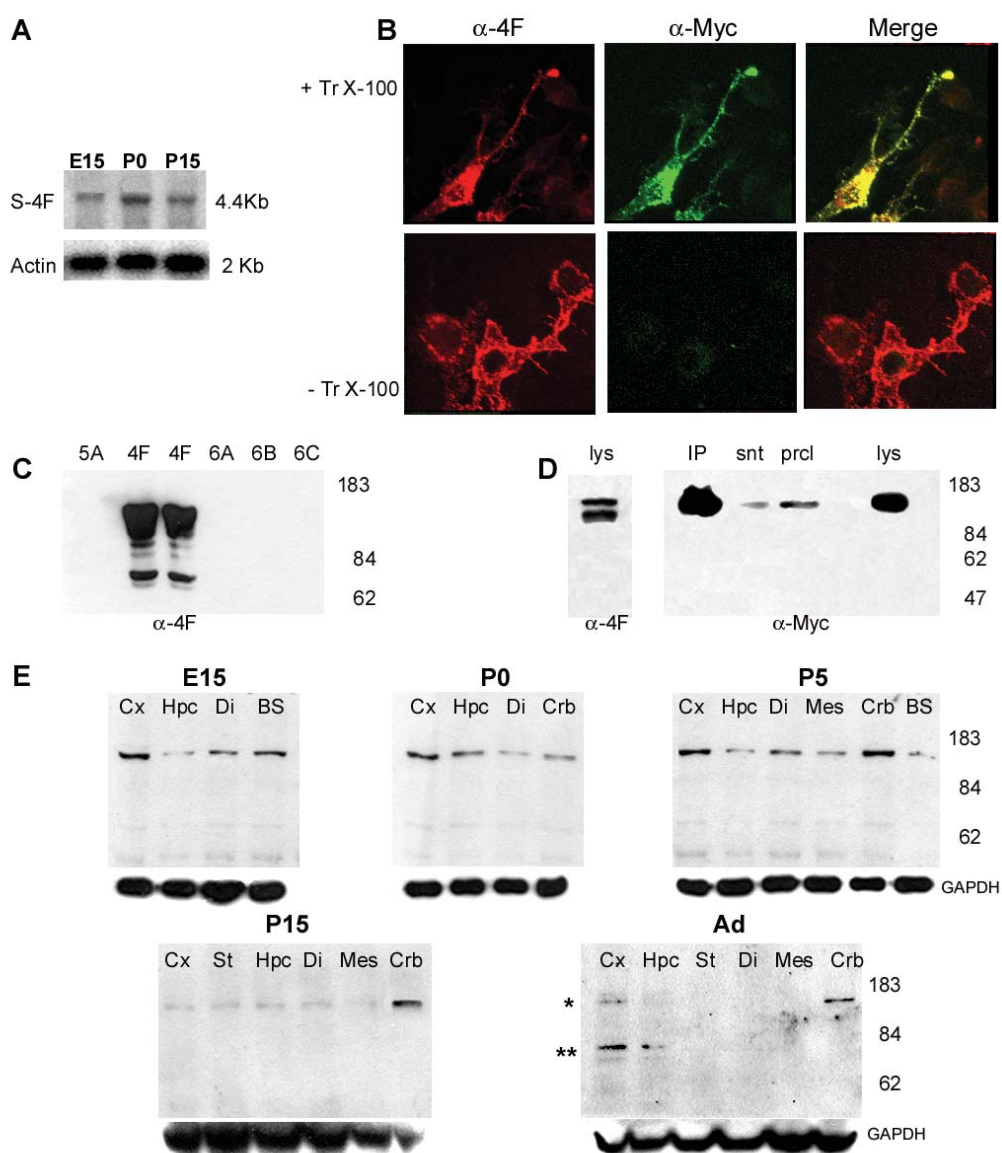


Figura 1.2. Detección de Sema4F por NB y análisis inmunoquímico. **A**, NB de 5µg de RNA total a tres edades (E15, P0 y P15) contra una sonda de cDNA *antisense* de Sema4F (carril superior). En el carril inferior, control de carga usando el cDNA de actina como sonda. **B**, **C** y **D** ilustran la validación del antisuero anti-4F. **B**, dos tipos de marcaje inmunocitoquímico de células COS1. Las células COS1 se transfectaron con el vector de expresión de Sema4F unido a Myc. Se muestra la IR anti-4F en rojo mediante fluorescencia TRITC y la IR anti-Myc en verde mediante FITC. En el panel superior, las células se permeabilizaron con Triton X-100 durante el procedimiento; en el panel inferior no se utilizaron detergentes durante la inmunodetección. Sólo las células permeabilizadas muestran solapamiento del marcaje contra el epítipo intracelular Myc, validando así la especificidad del antisuero. **C**, WB de extractos de proteína de células COS1 transfectadas con vectores de expresión de varias semaforinas. Sólo la Sema4F se detecta con anti-4F. **D**, Ensayo de inmunoprecipitación aplicado a extractos de proteína de células COS1 transfectadas, revelado con antisueros anti-4F o anti-Myc. **E**, la distribución de Sema4F durante el desarrollo del cerebro muestra una banda de aproximadamente 150 KDa (*), muy marcada de E15 a P5 y menos posteriormente. En las muestras de animales de más edad se aprecia una disminución de la cantidad de Sema4F y la aparición de una banda de 75-80 KDa (**). Como control de carga se usó GAPDH. *BS*, tallo cerebral; *Crb*, cerebelo; *Cx*, corteza cerebral; *Di*, diencéfalo; *Hpc*, hipocampo; *IP*, inmunoprecipitación; *Mes*, mesencéfalo; *snt*, sobrenadante de la muestra inmunoprecipitada; *precl*, sobrenadante de la muestra preclarificada, y *St*, estriado. Los pesos moleculares se indican a la derecha de los paneles (Kilobases en A, Kilodaltons en C, D, y E).

En el ensayo de WB la Sema4F se detecta como una única banda de unos 150KDa en tejido neural a partir de E15. La Sema4F es especialmente abundante en la corteza cerebral en estadios perinatales, disminuyendo en esta región a partir de P5 (Fig. 1.2E). En el cerebelo es abundante en etapas postnatales. En el adulto, la proteína se detecta mayoritariamente en el cerebelo, el hipocampo y la corteza cerebral (Fig. 1.2E). Es interesante destacar la presencia de una banda adicional de unos 75-80KDa encontrada exclusivamente en el cerebro adulto (marcada como ** en la Fig. 2E).

A continuación realizamos un análisis inmunohistoquímico (IHC) para determinar el patrón de expresión de la proteína en distintas etapas y zonas del cerebro. En general, la inmunorreactividad (IR) de la proteína Sema4F solapa con el patrón de expresión de su mRNA; así, la mayoría de las regiones cerebrales expresan la proteína Sema4F a partir de E14 (Figs. 1.3A y L). La expresión es especialmente prominente en el bulbo olfativo, la corteza cerebral, el hipocampo y el tronco cerebral. A E14, sin embargo, algunas capas proliferativas que expresaban el mRNA de Sema4F no muestran tinción para la proteína (comparar por ejemplo MGE en Figs. 1.1A y 1.3A), lo que sugiere que la proteína se expresa con cierto retraso respecto al gen, indicando una expresión regulada. El marcaje es alto entre E16 y P0 (Figs. 1.3B, D, E, G, H y K). El hipocampo se marca muy fuertemente a E18 (Figs. 1.3B y E) y la reactividad se mantiene elevada a P15 (Fig. 1.3F) y en el adulto (Fig. 1.3C). La aSVZ está intensamente marcada alrededor de P0 (Fig. 1.3H), y se mantiene reactiva en el adulto (Fig. 1.3I). El bulbo olfativo también se marca durante el desarrollo y en el adulto, principalmente en las capas de células mitral y glomerular (Fig. 1.3N). El RMS también mantiene su marcaje (Fig. 1.3M). La CP es reactiva a edades embrionarias (Figs. 1.3A, B y D), y la corteza cerebral se mantiene hasta edades adultas, con IR preferente en la corteza entorrinal (Fig. 1.3J). El hipotálamo muestra un marcaje débil aunque diseminado a edades embrionarias (Fig. 1.3B), más elevado en áreas concretas a edades postnatales (Fig. 1.3O). Se encontró una más que remarcable intensidad de marcaje a P10 cerca de los núcleos hipotalámicos arcuato y posterior (Fig. 1.3O, ver también Fig. 1.5), una región del OMP cercana al tercer ventrículo a través de la cual los OPCs migran a edades anteriores. En el cerebro posterior, algunos núcleos aparecen muy marcados, como el núcleo oculomotor, el área gris periacueductal, los colículos y los núcleos de rafe y pararrubral (Fig. 1.3K). El núcleo facial también es inmunorreactivo a P0 (Fig. 1.3L, señalado como 7nu), y la mayoría de los tipos celulares del cerebelo permanecen reactivos durante el desarrollo y también en el adulto (Figs. 1.3P y Q).

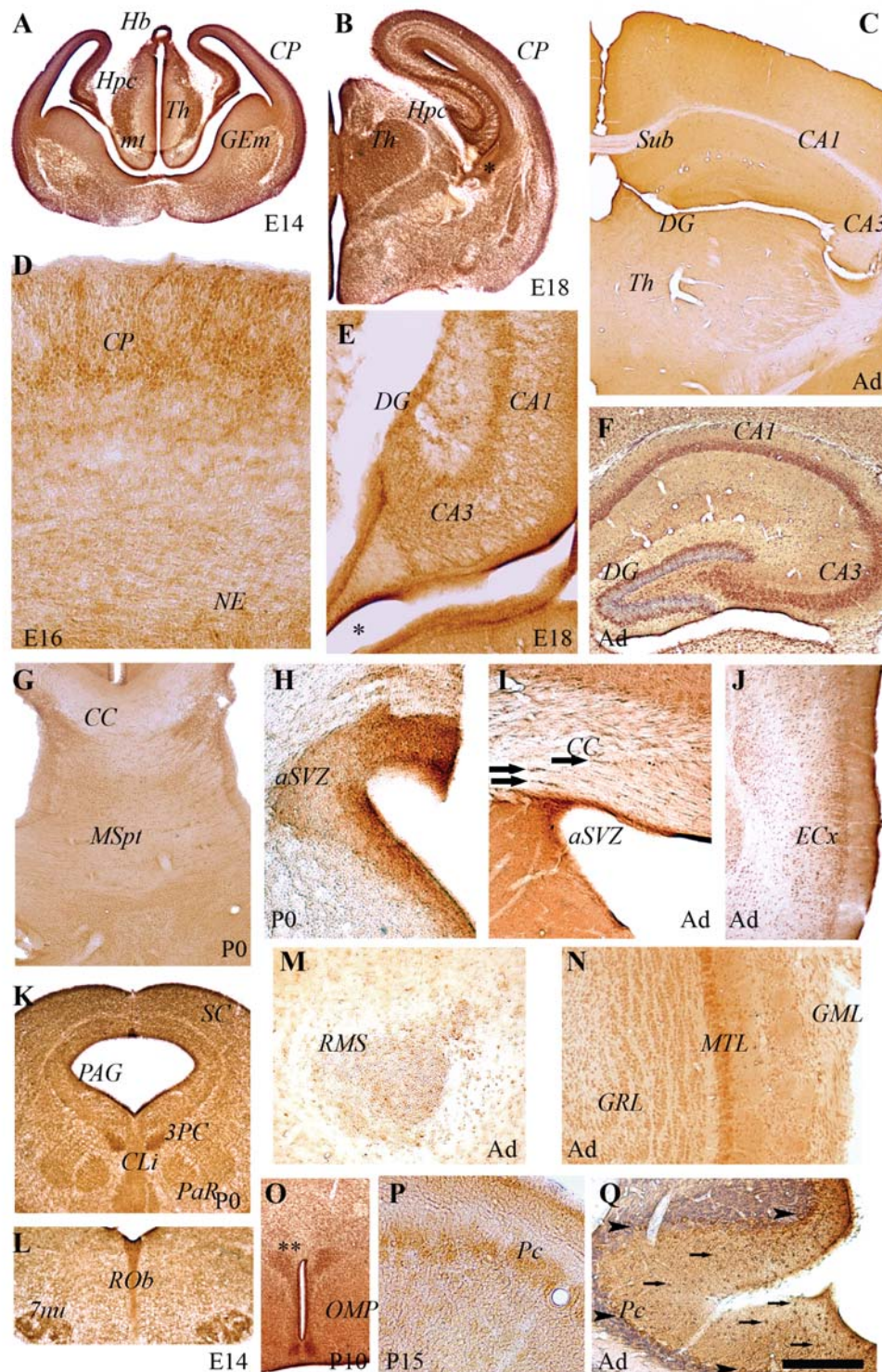


Figura 1.3. Análisis inmunohistoquímico de Sema4F durante el desarrollo. **A-C**, vista panorámica del cerebro anterior a distintas edades. **D**, placa cortical y neuroepitelio de un embrión E16. **E-F**, vista del hipocampo a diferentes edades. Los asteriscos (*) en B y E marcan la vía de migración de OPCs en el alveus y la fimbria. **G**, septo y cuerpo calloso a P0. **H, I**, zona subventricular a diferentes edades. **J**, corteza entorrinal adulta. **K**, mesencéfalo, mostrando el área gris periacueductal y varios núcleos mesencefálicos. **L**, cerebro posterior a E14. **M**, vía migratoria rostral del cerebro anterior adulto. **N**, vista parcial del bulbo olfativo adulto. **O**, hipotálamo ventral, mostrando la vía de migración de OPCs. **P, Q**, cerebelo a P15 y edad adulta. 3PC, núcleo oculomotor; aSVZ, zona subventricular anterior; CA1 y CA3, capas piramidales del hipocampo; CC, cuerpo calloso; CLi, núcleo de rafe caudal linear; CP, placa cortical; DG, giro dentado; ECx, corteza entorrinal; GEm, eminencia ganglionar; GML, capa glomerular del bulbo olfativo; GRL, capa granular

del bulbo olfativo; *Hb*, habénula; *mt*, tracto mamilotalámico; *MSpt*, septo medial; *MTL*, capa mitral del bulbo olfativo; *7nu*, núcleo facial; *NE*, neuroepitelio; *OMP*, vía de migración de oligodendrocitos; *PAG*, área gris periacueductal; *PaR*, núcleo pararrubral; *Pc*, célula de Purkinje; *RMS*, vía migratoria rostral; *ROb*, núcleo de rafe *obscurus*; *SC*, colículo superior; *Sub*, subiculum; y *Th*, tálamo. *, vía de migración de oligodendrocitos en el hipocampo; **, vía de migración de oligodendrocitos en el hipotálamo. Las flechas de I apuntan a oligodendrocitos del cuerpo calloso, y de Q a interneuronas de la capa molecular cerebelar. Las flechas de Q marcan células de Purkinje. F, J y K están contra-teñidas con Nissl. Escala de las barras: 500 μm en A-C, J y Q, 250 μm en G, H, K y L, 200 μm en F, I, J, M y O, y 100 μm en D, E, I, N y P.

La expresión de Sema4F es baja pero apreciable en neuronas adultas (Figs. 1.3C, F, J, N y Q) y, en el hipocampo, es particularmente relevante en las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la CA1 (rectángulos en la figura 1.4A) y alrededor de los somas de las células granulares del giro dentado (cuadrados en la figura 1.4B).

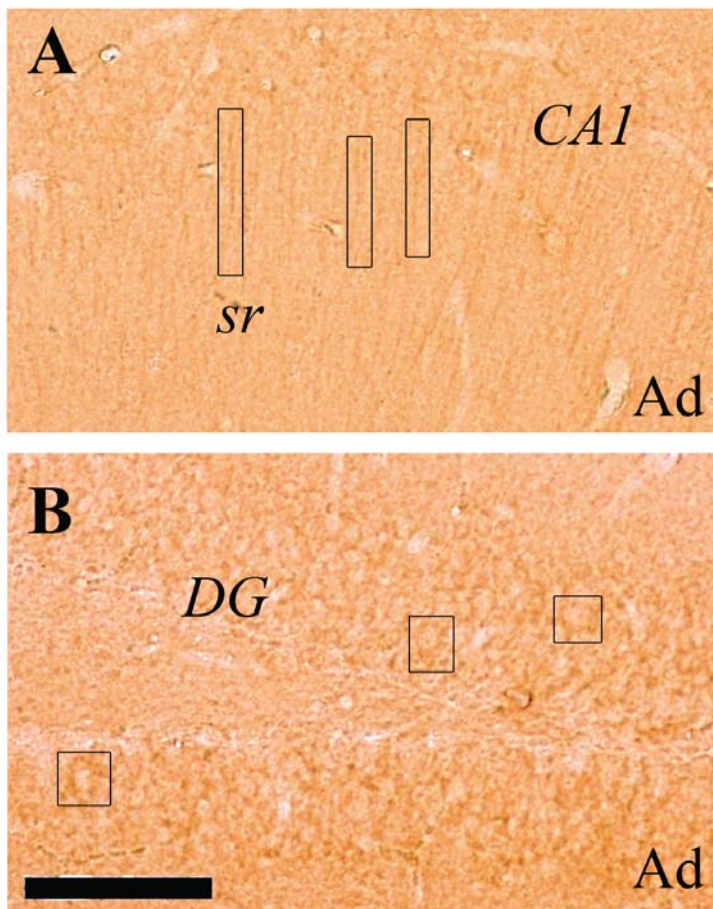


Figura 1.4. A,B, IR anti-4F en varias áreas del hipocampo adulto. **A**, IR en dendritas apicales del *stratum radiatum*. **B**, IR alrededor de células granulares del giro dentado. Los rectángulos en A y B muestran algunas áreas con IR relevante. *CA1*, capa piramidal del hipocampo; *DG*, giro dentado; *sr*, *stratum radiatum*. Barra de escala: 100 μm .

Para profundizar en la localización de la proteína Sema4F, analizamos su expresión en el hipocampo mediante técnicas de microscopía electrónica. Así, vimos que la IR de Sema4F aparece fundamentalmente en cuerpos celulares y dendritas. El marcaje se aprecia en espinas y en el tronco dendrítico de neuronas piramidales (Figs. 1.5A y B), así como en troncos dendríticos de interneuronas, las cuales muestran múltiples contactos sinápticos (Fig. 1.5C). Sin embargo, no se detecta una IR significativa en terminales presinápticos. Estos datos muestran que la Sema4F se localiza preferencialmente en el compartimento postsináptico.

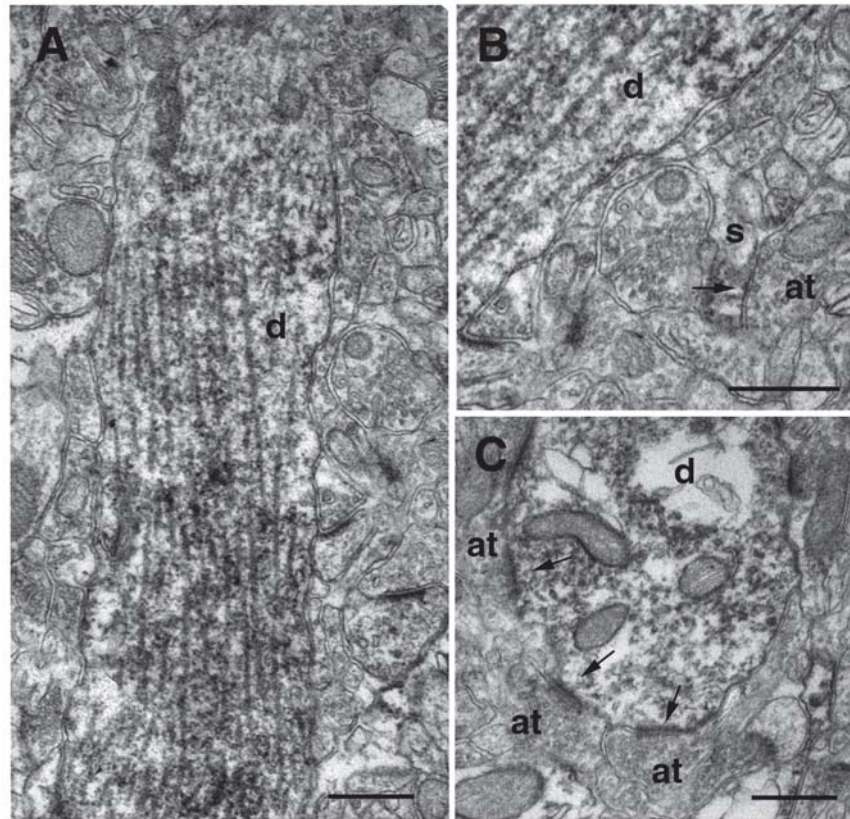


Figura 1.5. Hipocampus de ratón adulto inmunomarcados para microscopía electrónica. **A, B**, los cortes incluidos en araldita y revelados con DAB muestran la acumulación de la IR de Sema4F principalmente en el tronco dendrítico de neuronas piramidales del *stratum radiatum* (A). Se observa un marcaje débil en algunas espinas, que reciben contactos (flechas) de terminales axónicas excitatorias en B. **C**, dendrita teñida de una célula inhibitoria que recibe múltiples y característicos contactos excitatorios (flechas) de distintos terminales axónicos (at) no inmunorreactivos. *d*, tronco dendrítico; *s*, espinas dendríticas; *at*, terminal axónico. Barras de escala: 0.5 μ m.

1.3. Expresión de Sema4F en células neuronales y oligodendrogliales.

Como hemos visto anteriormente, la inmunorreactividad más remarcable de Sema4F corresponde a células neurales y a sus precursores. Sin embargo, también es evidente un marcaje del mRNA y la proteína en oligodendrocitos maduros del cuerpo calloso adulto (flechas en Figs. 1.3I y 1.6I; flechas apuntando a células con forma alargada en la Fig. 1.6H) y en regiones ricas en OPCs, como el tracto mamilotalámico en E14 (Fig. 1.3A), la fimbria embrionaria (Figs. 1.1B, E, y 1.3B, E) y el hipotálamo postnatal temprano (Figs. 1.3O y 1.6A). En los tractos fibrosos principales, el transcrito y la proteína de Sema4F aparecen en células de forma oligodendroglial a P0 tanto en el cuerpo calloso (Figs. 1.1G y 1.3G, flechas en Fig. 1.6F), como en la comisura anterior (flechas en la Fig. 1.6G). Incluso a P15 se encuentran células que expresan Sema4F cerca del núcleo arcuato (Figs. 1.6B y C). Los ensayos de ISH mostraban que estas regiones a P10 eran ricas en células que transcriben Sema4F (Figs. 1.6D y E).

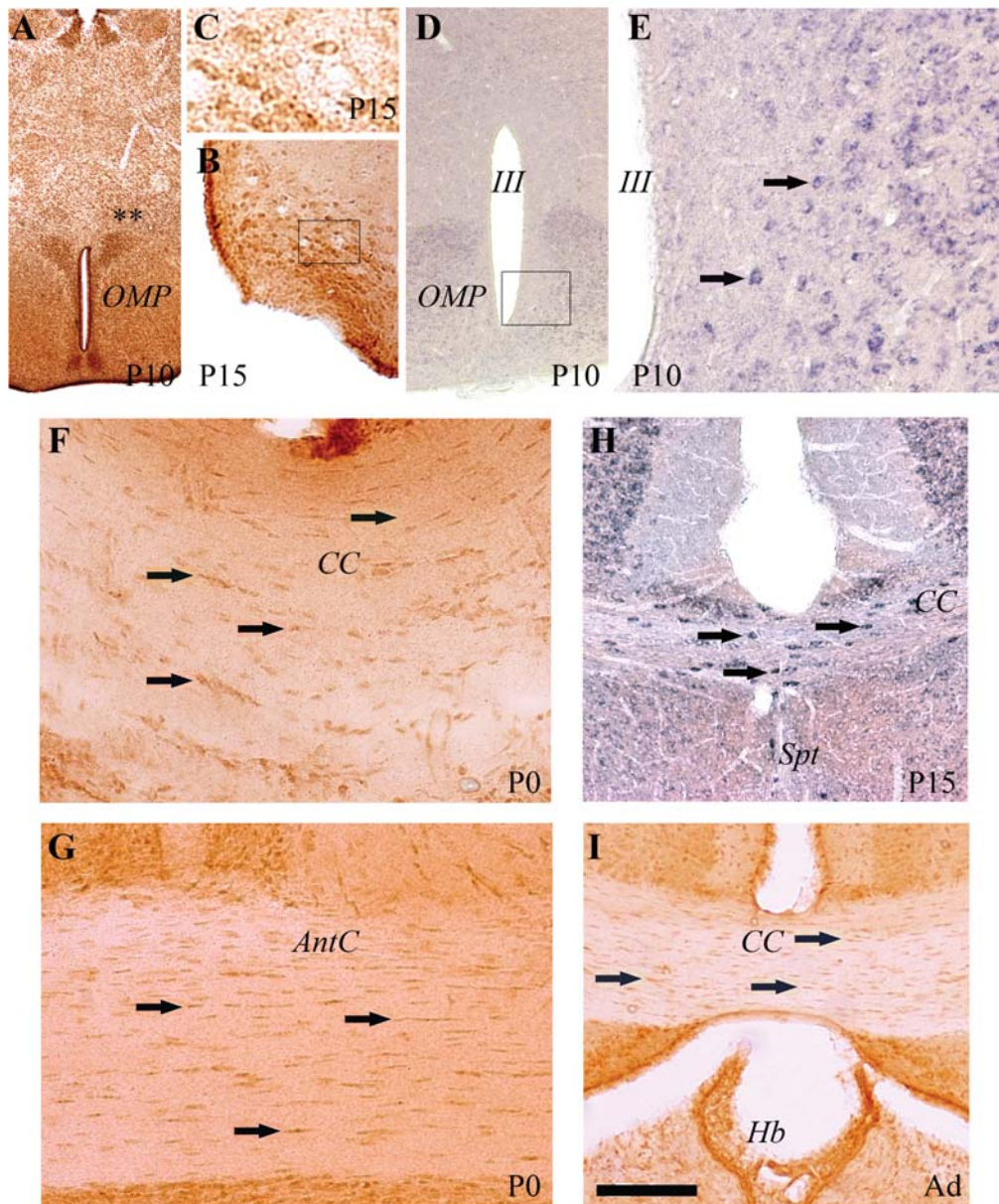


Figura 1.6. Comparación de los patrones de expresión de Sema4F a mayor aumento. **A**, distribución de la IR de la proteína en un hipotálamo ventral a P10. Los asteriscos (**) marcan la vía de migración de OPCs. **B**, **C**, células inmunorreactivas para Sema4F en un hipotálamo ventral a P15. C corresponde al rectángulo de B a mayor aumento. **D**, **E**, distribución del mRNA en un hipotálamo P10. E corresponde al rectángulo de D a mayor aumento. La flecha señala algunas células muy marcadas. **F**, **G**, estructuras inmunorreactivas para Sema4F a P0. F corresponde al cuerpo calloso y G a la comisura anterior. **H**, distribución del mRNA en un cuerpo calloso a P15. Las flechas indican oligodendrocitos marcados. **I**, IR de anti-4F en un cuerpo calloso adulto. Las flechas marcan oligodendrocitos inmunorreactivos. *AntC*, comisura anterior; *CC*, cuerpo calloso; *Hb*, habénula; *OMP*, vía de migración de oligodendrocitos; *Spt*, septo; y **, OMP del hipotálamo. Las flechas en F-I marcan células reactivas en los principales tractos de fibras. Los cuadrados en B y D señalan las regiones ampliadas en C y E, respectivamente. Barras de escala: 250 μ m en A, 200 μ m en B, D y H, 100 μ m en E, F, G, e I, y 50 μ m en C.

En secciones de cerebro de edad E16 realizamos experimentos de marcaje doble para Sema4F y Olig2, un factor de transcripción de oligodendrocitos. Encontramos algunas las células Olig2-positivas entre el gran número de células que expresan Sema4F alrededor del 3^{er} ventrículo (Figs. 1.7A-C) y el primordio cerebelar (Figs. 1.7D-F). Prácticamente todas las células Olig2-positivas también muestran marcaje con anti-4F.

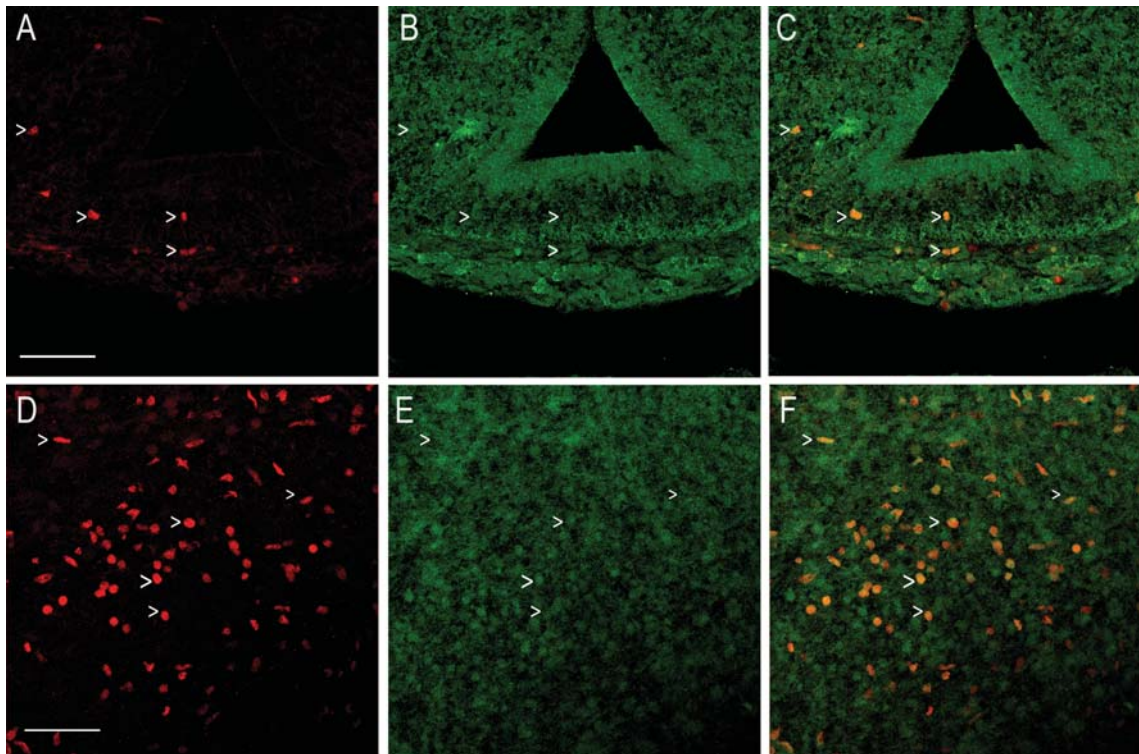


Figura 1.7. Marcaje doble con anti-4F y anti-Olig2 en cortes de cerebro E16.5. **A-C**, región hipotalámica alrededor del tercer ventrículo. **D-F**, primordio cerebelar profundo. A y D corresponden a la IR de anti-Olig2; B y E corresponden a la IR de anti-4F; C y F son imágenes superpuestas. Las puntas de flecha indican células doblemente marcadas. Barra de escala: 50 μm .

La observación de que los oligodendrocitos y sus precursores se marcan con anti-4F nos llevó a examinar la expresión de esta semaforina en regiones del cerebro ricas en OPCs. Así, en primer lugar, observamos células que expresan Sema4F en el nervio óptico embrionario (Figs. 1.8A y B), estructura que contiene OPCs que llegan del área preóptica [50, 167]. En segundo lugar, utilizamos células del ratón *plp-GFP*, que expresa el gen reportero en OPCs desde E16 [168]. Los cultivos de OPCs derivados de nervio óptico de este ratón muestran coexpresión de Sema4F y GFP en la mayoría de las células *plp-GFP*-positivas (Figs. 1.8C-E). La Sema4F aparece en el cuerpo y prolongaciones de los OPCs (Figs. 1.8F-H). Estos resultados se confirmaron mediante una tinción doble de OPCs de nervio óptico de ratones control con los anticuerpos anti-4F y anti-Olig2, que de nuevo muestran expresión de Sema4F en prácticamente todas las células positivas para Olig2 (Figs. 1.8I-K).

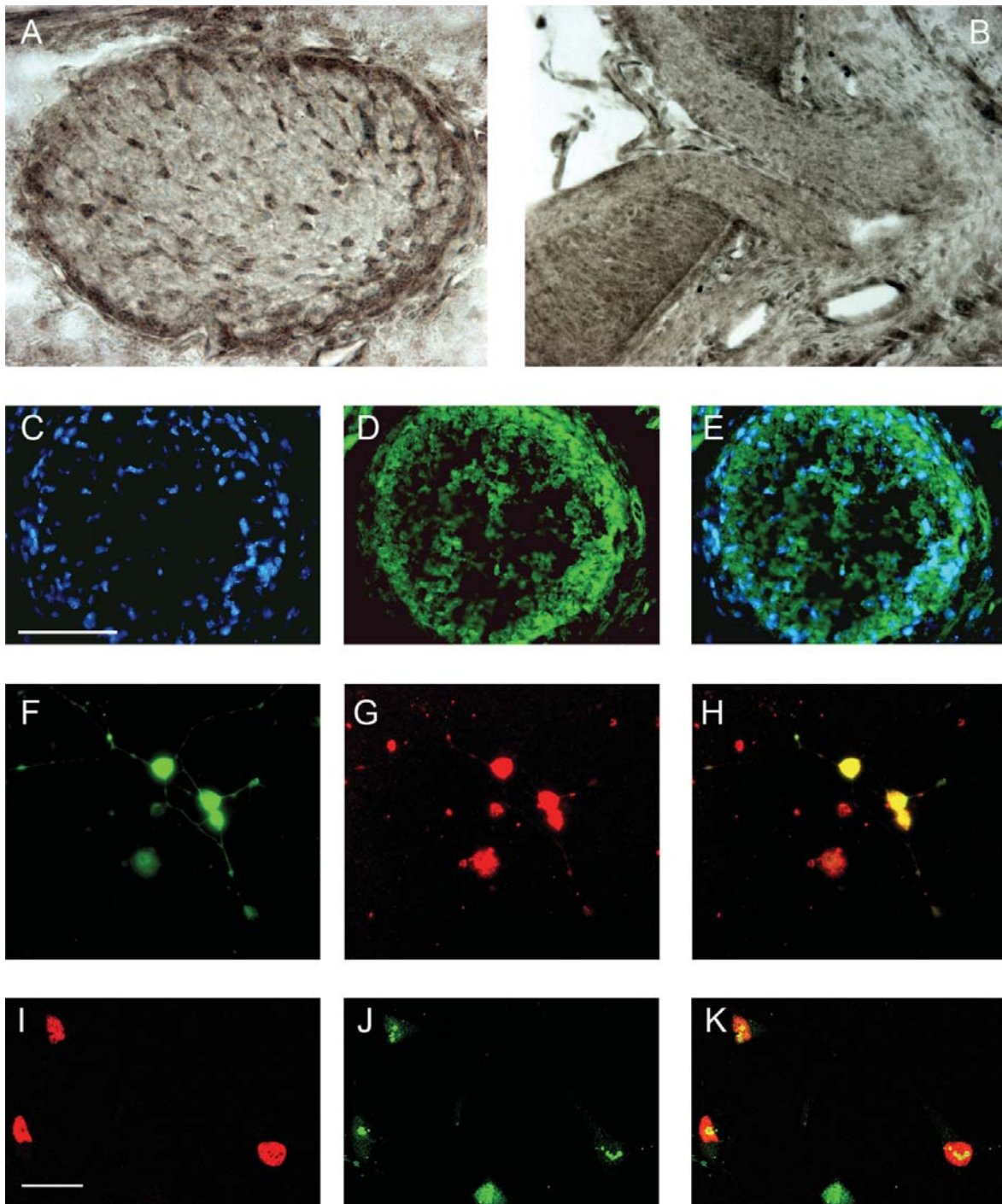


Figura 1.8. Expresión de Sema4F en precursores de oligodendrocitos de nervio óptico. **A**, sección transversal del nervio óptico de un embrión E16.5 de ratón; se muestran algunas células con morfología bipolar y teñidas para Sema4F. El marcaje es también intenso alrededor del nervio óptico. **B**, sección frontal de la cabeza entera incluyendo el ojo y el segmento inicial del nervio óptico. Se detectan células Sema4F-positivas dentro del nervio y un fuerte marcaje en la mayoría de las capas de la retina. La capa de la fibra del nervio óptico (ONF) no aparece teñida. **C-E**, cubres cultivados con OPCs de nervio óptico E16.5. **C**, células marcadas con yoduro de propidio. **D**, IR anti-4F. **E**, imagen superpuesta de cultivos de OPCs obtenidos de ratones transgénicos plp-GFP a E16.5. **F-H**, ICC anti-4F en cultivos de ratones plp-GFP. **F**, marcaje de GFP en células que expresan el promotor plp. **G**, IR anti-4F. **H**, foto superpuesta. **I-K**, ICC anti-Olig2 y anti-4F en cultivos de células de ratones control. **I**, IR anti-olig2. **J**, IR anti-4F. **K**, foto superpuesta. Barras de escala: 100 μ m en A, 200 μ m en B, 300 μ m en C-E y 40 μ m en F-K.

1.4. Papel de Sema4F en la migración de OPCs de nervio óptico durante el desarrollo.

Debido a las propiedades biológicas de Sema4F y a su expresión en OPCs migratorios, estudiamos el papel de esta proteína utilizando un paradigma clásico para analizar la migración de OPCs: el cultivo de explantes de nervio óptico en geles de colágeno tridimensionales [50, 60, 169, 170]. En primer lugar, generamos medio condicionado Sema4F (llamado “medio 4F” o “4F”) mediante la transfección de células 293T con el vector de expresión de Sema4Fe (que codifica para la parte extracelular de la proteína), o con un vector control en el caso del medio condicionado control (“medio control” o “CT”). La incubación de explantes de nervio óptico con medio 4F reduce el número de OPCs que salen del explante, comparado con explantes tratados con medio control (Figs. 1.9A, B y E). Es interesante comprobar que el bloqueo de la actividad Sema4F endógena, al incubarlo con el anticuerpo anti-4F, resulta en un incremento en la migración de OPCs respecto al control (Figs. 1.9C,E).

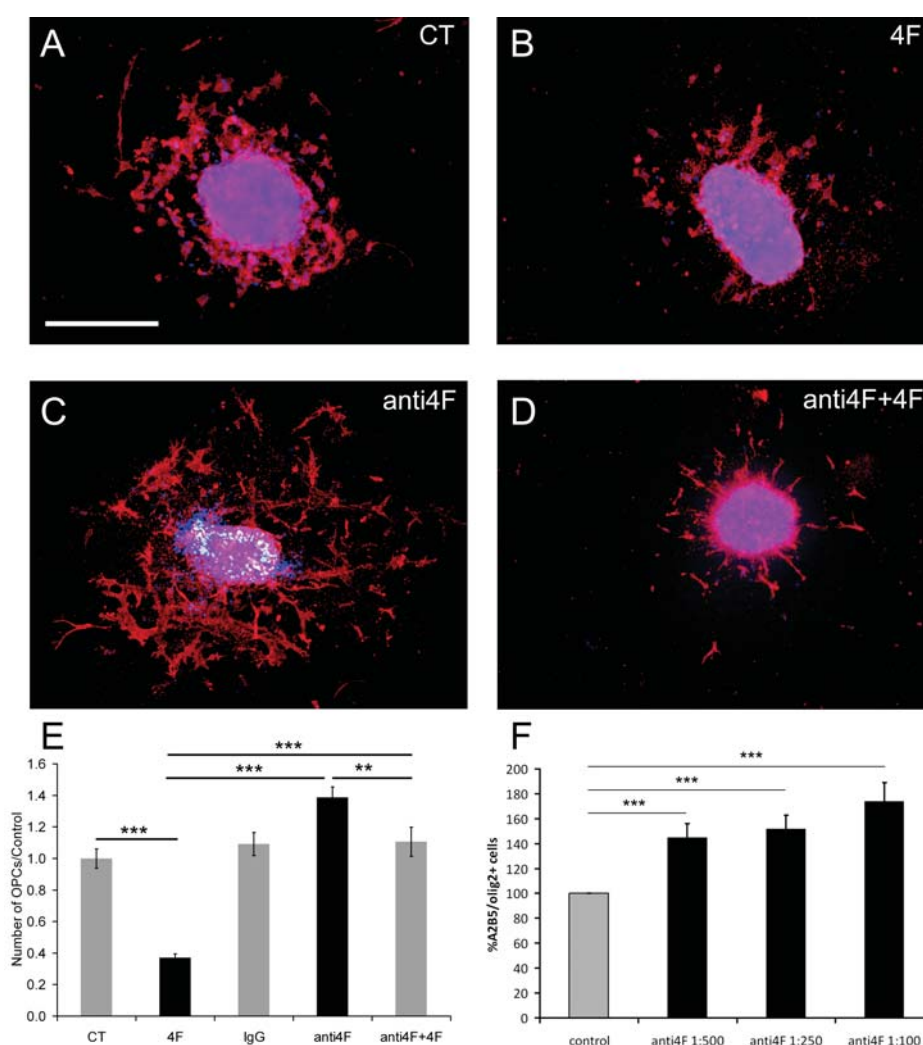


Figura 1.9. Sema4F regula la migración de oligodendrocitos en explantes de nervio óptico. **A**, explantes de nervio óptico cultivados en condiciones control. **B**, explantes de nervio óptico cultivados en la presencia de Sema4Fe exógena. **C**, explantes de nervio óptico cultivados en presencia del antisuero anti-4F. **D**, explantes de nervio óptico cultivados en presencia del antisuero anti-4F y pretratados con Sema4F. Todos los cultivos se tiñeron con yoduro de propidio y el anticuerpo A2B5 (fluorescencia en rojo). **E**, cuantificación de los ensayos A-D como el número total de células que salen del explante. Las barras ilustran la tasa de migración

de explantes en medio control, en presencia de Sema4F, de anticuerpo anti-4F, de IgGs preinmunes irrelevantes o de medio Sema4F preincubado con anti-4F. **F**, migración de OPCs disociados en cámaras de quimiotaxis, en respuesta a concentraciones crecientes de anti-4F para bloquear la Sema4F de la superficie. Se indica la media \pm el error estándar de la media (SEM). Los asteriscos indican la confianza en las diferencias estadísticas obtenidas mediante el test t-test (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Barra de escala: 70 μm .

No se encontraron diferencias en la distancia máxima migrada en presencia del medio condicionado (OPCs cultivados con medio control: $316 \pm 13 \mu\text{m}$; OPCs cultivados con medio condicionado Sema4Fe: $293 \pm 13 \mu\text{m}$; $p = 0.328$, t-test), pero sí se encontró un aumento significativo en presencia del anticuerpo anti-4F (IgG diluido 1:300: $326 \pm 28 \mu\text{m}$; anti-4F: $478 \pm 28 \mu\text{m}$; $p = 0.003$, t-test).

Para confirmar el incremento en la migración de OPCs en cultivos control tratados con anti-Sema4F y los efectos dependientes de dosis del anticuerpo usamos cámaras quimiotáticas. La gráfica mostrada en la Fig. 1.9F muestra la tasa de migración de OPCs cuando la Sema4F de la superficie de estas células se bloquea por el anticuerpo. Nuestros resultados muestran que la Sema4F expresada endógenamente por los OPCs regula la migración de estas células, bien de manera paracrina o autocrina.

Por último, quisimos determinar si los efectos de Sema4F en migración se debían a algún tipo de defecto morfológico en los OPCs que perjudicara su movimiento. Para ello cultivamos explantes de nervio óptico de ratón en placas forradas con poli-L-ornitina + laminina e inmediatamente después de añadirles medio condicionado control o 4F los filmamos durante 4 horas. El posterior análisis no reveló ningún cambio en la morfología de las células tratadas con medio control o 4F (datos no mostrados).

1.5. Sema4F no afecta a la proliferación de OPCs pero induce su diferenciación.

Para estudiar si la Sema4F afecta a la proliferación o a la supervivencia de los OPCs, se analizó la incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU) o yoduro de propidio. No se observaron cambios ni en la supervivencia ni en la proliferación de los OPCs en estas condiciones (Fig. 1.10A), ni tampoco se vieron diferencias significativas en el tamaño de los explantes entre los distintos grupos experimentales (datos no mostrados).

Para examinar si la Sema4F afecta a la diferenciación de los OPCs a oligodendrocitos maduros, incubamos OPCs purificados de cerebro neonatal de rata con esta proteína. Sembrando estas células en placas previamente forradas con Sema4F se observó un incremento en la diferenciación de OPCs, medida como el porcentaje de células que expresan la proteína básica de mielina (MBP) (Fig. 1.10B). La gráfica muestra la relación entre las células MBP⁺ respecto al número total de células (teñidas con DAPI). La adición de medio 4F dobla el número de OPCs MBP⁺ (Figs. 1.10C-F). Este efecto se bloquea por la incubación con el anticuerpo de Sema4F, con el que se obtienen valores claramente por debajo de los observados en el control. De nuevo, estos datos apuntan a un papel importante de la Sema4F producida endógenamente en la diferenciación de los oligodendrocitos.

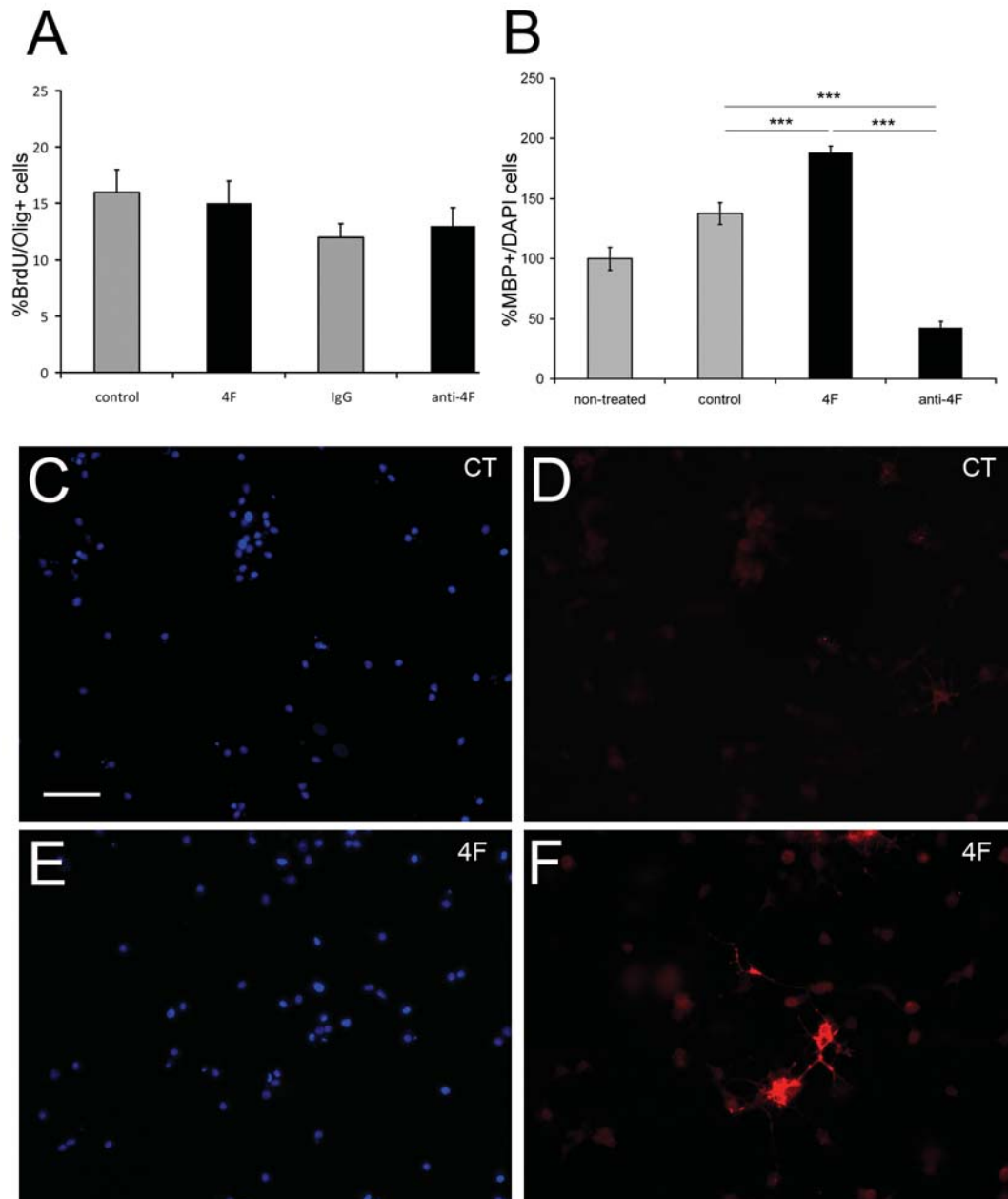


Figura 1.10. Sema4F no afecta a la proliferación de OPCs, aunque acelera su diferenciación. **A**, porcentaje de incorporación de BrdU en OPCs migratorios en condiciones control, en presencia de Sema4F y en presencia de bien una IgG irrelevante o anti-4F. No se observaron cambios estadísticos al compararlos con sus respectivos grupos de control. **B**, tasa de diferenciación, medida como el porcentaje de células teñidas con MBP, cuando los OPCs se cultivaron en placas forradas con poli-D-lisina sola (*non-treated*) o suplementadas con medio condicionado procedente de células 293T sin transfectar (control) o de células transfectadas con Sema4Fe (4F). Anti-4F corresponde a las mismas condiciones que 4F pero incluyendo anti-4F en el medio de cultivo. **C-F**, OPCs teñidos con anti-MBP y con DAPI. **C,D**, células crecidas en placas forradas con poli-D-lisina y medio control. **E, F**, células crecidas en placas forradas con poli-D-lisina y medio 4F. **C, E**, tinción con DAPI. **D, F**, tinción con anti-MBP. Las barras indican la media \pm el error estándar de la media (SEM). Los asteriscos indican la confianza en las diferencias estadísticas obtenidas mediante el test t-test (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$). Barra de escala: 50 μ m. *CT*, células tratadas con medio control; *4F*, células tratadas con medio 4F.

CAPÍTULO 2:

Vía de señalización de Sema4F en OPCs:
Papel de FAK

Como hemos visto en el capítulo 1, la semaforina transmembranal Sema4F se expresa en neuronas, pero también en oligodendrocitos y sus precursores durante el desarrollo y en el adulto. La función de esta proteína en OPCs incluye varios aspectos del desarrollo de estas células; así, la Sema4F inhibe la migración de OPCs de nervio óptico y favorece la diferenciación a oligodendrocitos maduros. Se desconoce el mecanismo de actuación de esta semaforina, de la que no se sabe ni siquiera su receptor, pero los efectos anti-migratorios necesariamente deben cursar con cambios en el citoesqueleto. Como hemos destacado en la introducción, FAK es un mediador crucial en procesos que requieren remodelación del citoesqueleto, incluidos migración, guía axonal, ramificación neurítica, y remodelación de espinas dendríticas. Por eso nos planteamos si FAK se encuentra en la vía de señalización de la Sema4F.

2.1 Detección de FAK en oligodendrocitos.

En primer lugar, quisimos comprobar si podemos detectar FAK en células gliales. Para ello, llevamos a cabo una serie de Western Blots (WB) en extractos de OPCs, astrocitos y neuronas. Revelamos con diversos anticuerpos dirigidos contra residuos específicos fosforilados de FAK, que como hemos visto son cruciales para su función. Como se puede observar en la figura 2.1, FAK existe en diferentes estados de fosforilación en función del linaje celular. Así, observamos una fuerte fosforilación basal en el residuo de autofosforilación, Y397, especialmente en neuronas y astrocitos pero muy baja en OPCs. En neuronas y astrocitos aparece también una importante fosforilación de los residuos Y861 (sitio de unión de p130Cas; desfosforilado en respuesta a Sema3A y fosforilado en respuesta a Net-1 [79, 131, 132]) e Y925 (sitio de unión de Grb2 [98]), más fuerte en astrocitos. En el caso de OPCs, Y861 aparece muy poco fosforilado mientras que la banda apreciada con anti-PY925-FAK es algo más intensa. Estos datos nos indican que FAK se puede encontrar regulado de distinta forma en OPCs, neuronas y astrocitos.

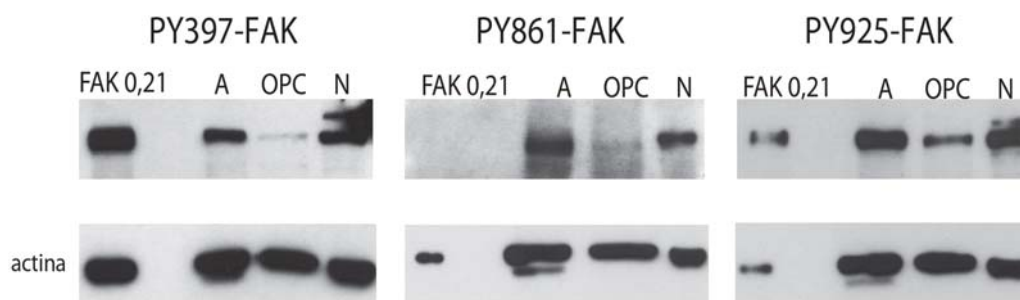


Figura 2.1. WB de FAK fosforilado en diferentes residuos. Los paneles superiores muestran el revelado con el anticuerpo correspondiente, y los inferiores el control de carga (actina). La muestra FAK0,21 corresponde a extractos de células transfectadas con plásmidos de expresión que contienen la isoforma de FAK⁰ o FAK^{all}, de modo que las dos isoformas están presentes. *A*, astrocitos; *OPC*, precursores de oligodendrocitos; *N*, neuronas.

A partir de OPCs de corteza de rata neonatal, llevamos a cabo varios experimentos para intentar dilucidar la vía de señalización por debajo de Sema4F. Así, tratamos OPCs con medio condicionado control o con medio condicionado Sema4F (medio 4F; ver Materiales y Métodos y Resultados:Capítulo 1) a distintas concentraciones y a distintos tiempos y miramos los posibles cambios en proteínas típicas de señalización intracelular, como la vía de las MAPK y de la proteína

glucógeno sintasa kinasa 3 (GSK3). Estas proteínas se han encontrado vías de señalización de otras semaforinas transmembranales, como 4D, 7A y 6C1 [171-173]. En nuestro caso, no encontramos cambios en la fosforilación ni en la cantidad de proteína al tratar los OPCs con medio 4F respecto al control (datos no mostrados).

Seguidamente decidimos estudiar si FAK se encontraba en la vía de señalización de Sema4F al tratar OPCs con medio condicionado. Podemos detectar un incremento en la fosforilación de FAK cuando tratamos los OPCs con medio 4F durante tan sólo 5 minutos. Este efecto se mantiene a los 15 minutos y es máximo a una concentración de medio 4F de 1x, de modo que ésta será la concentración que usaremos en la mayoría de los ensayos.

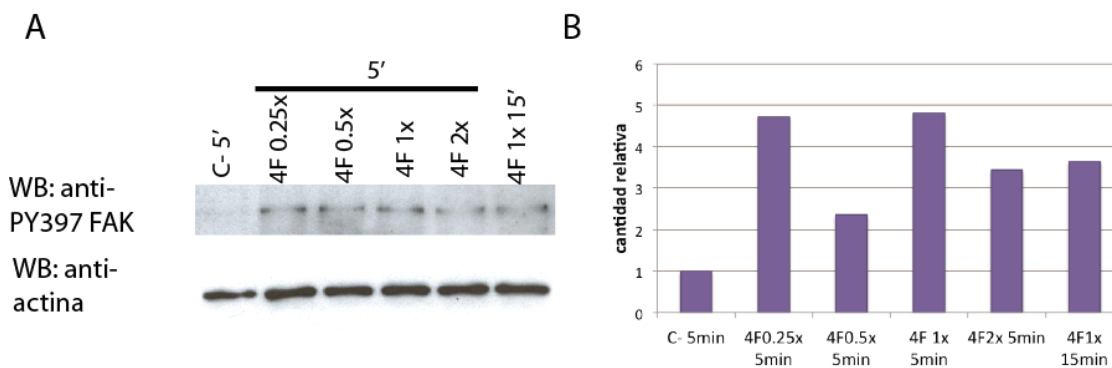


Figura 2.2. Cambios en la fosforilación de FAK en OPCs al tratar con medio 4F. OPCs purificados de rata neonatal fueron tratados con medio condicionado control (C-) o 4F a distintas concentraciones (0.25x, 0.5x, 1x y 2x) durante 5 ó 15 min. **A**, WB de extractos de OPCs tratados. Como control de carga se usó actina. **B**, Cuantificación de las bandas de A.

A continuación quisimos comprobar si la expresión o la distribución de FAK se ve alterada en OPCs tratados con medio condicionado 4F. Para ello, tratamos cultivos de OPCs con medio control o 4F durante diferentes tiempos y realizamos una inmunodetección de FAK total y FAK fosforilado. En la figura 2.3 se puede apreciar un moderado incremento en la señal para PY397-FAK en células tratadas con 4F, pero no cambios en su distribución intracelular.

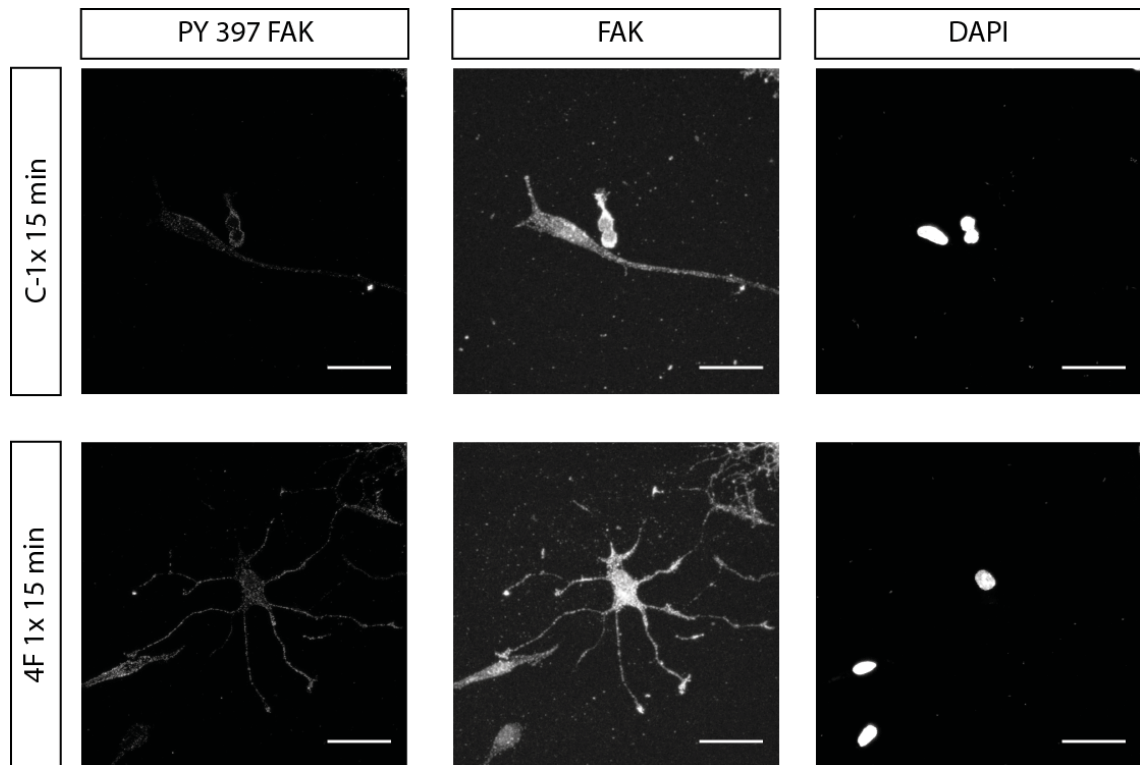


Figura 2.3. Inmunodetección de FAK en cultivos de OPCs tratados con medio control (C- 1x 15 min) o medio 4F (4F 1x 15 min). Barras de escala: 20µm

2.2. Efectos de FAK en la inhibición de la migración de OPCs mediada por Sema4F.

En el capítulo 1 vimos que uno de los efectos de Sema4F sobre los OPCs consistía en disminuir el número de células que salen de explantes de nervio óptico. Para comprobar si en este efecto también tiene un papel importante FAK, repetimos el experimento de migración en explantes pero en este caso añadiendo distintas concentraciones del inhibidor de FAK PF-573,228 (PF-228). Este compuesto muestra actividad inhibitoria del orden nanomolar hacia FAK, y presenta especificidad frente a FAK *versus* Pyk2 o RTKs [174]. Actúa inhibiendo la fosforilación de FAK en el residuo de autofosforilación Y397 [175] y se ha utilizado en diversos estudios de FAK en el SN [158, 162].

Así, tratamos los explantes de nervio óptico con varias concentraciones del inhibidor o de dimetilsulfóxido (DMSO) como control, además de con medio condicionado control o 4F. Como podemos observar en la figura 2.4, la presencia de DMSO no tiene ningún efecto sobre la inhibición ejercida por Sema4F, reproduciendo los resultados mostrados en la figura 1.9. La adición del inhibidor de FAK provoca una importante disminución del número de OPCs que salen del explante. Este resultado confirma que FAK tiene un efecto positivo sobre la migración de OPCs, y es coherente con el único artículo publicado hasta la fecha sobre este tema [158]. En cambio, cuando añadimos PF-228 + medio 4F la inhibición de PF-228 desaparece.

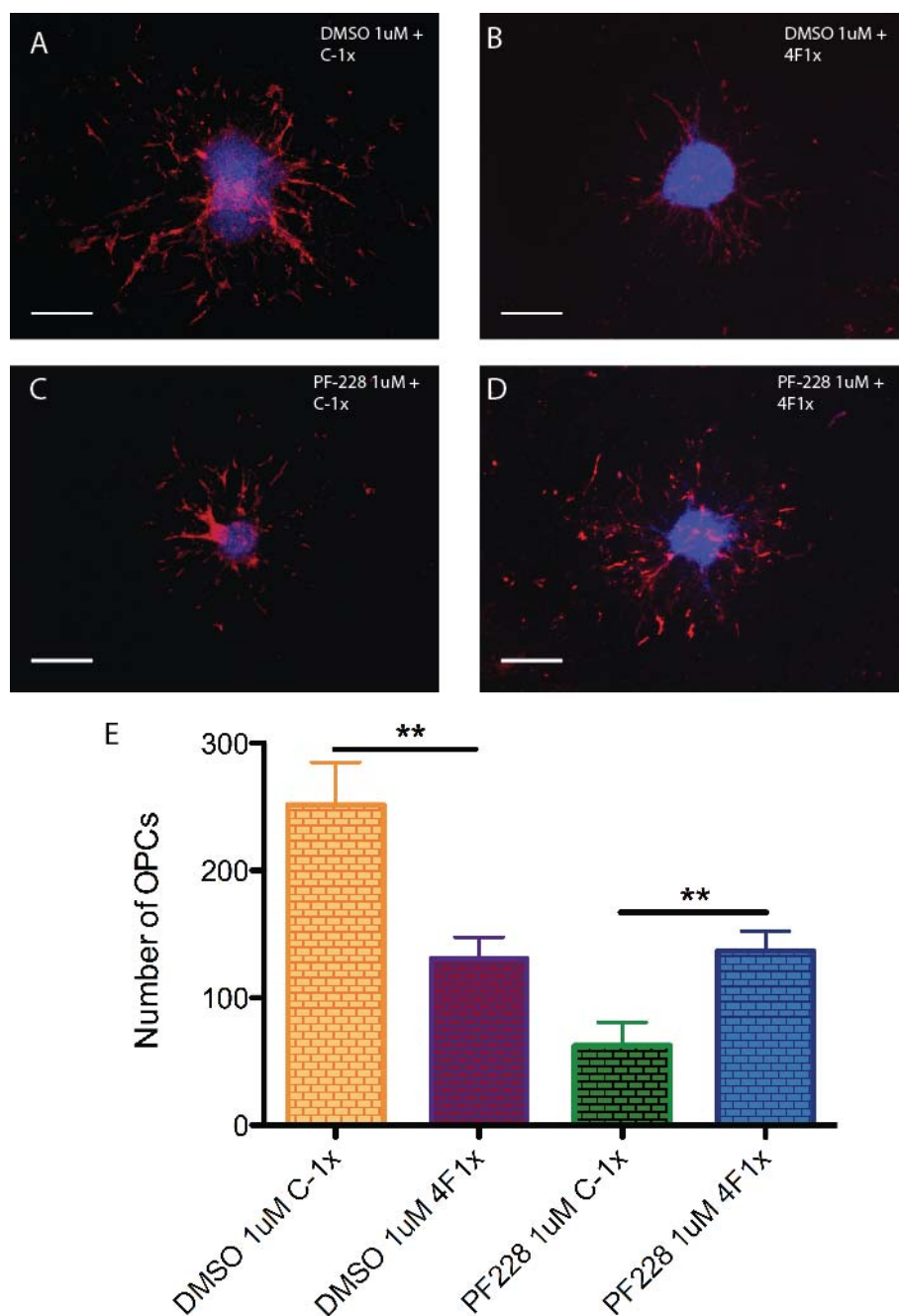


Figura 2.4. Efecto del inhibidor de FAK en la migración de OPCs tratados con medio condicionado de Sema4F. Explantes de nervio óptico de ratón tratados con DMSO (A,B) o PF-228 (C,D), además de con medio control (A,C) o condicionado para Sema4F (B,D). E, cuantificación del número de células que salen de cada explante. Se realizaron tres experimentos diferentes. Los asteriscos indican la confianza en la diferencia estadística (**: $p < 0.01$). *C-1x*, medio condicionado control 1x; *4F1x*, medio condicionado 4F 1x.

Por último, quisimos comprobar si el efecto promotor de la diferenciación mediado por Sema4F también está mediado por FAK. FAK ya se ha relacionado con la diferenciación de oligodendrocitos anteriormente [162]. Para ello, realizamos el experimento de diferenciación descrito en el capítulo 1 con la diferencia de que en este caso incluimos un tratamiento con DMSO ó PF-228 a los cultivos de OPCs tratados con medio control o medio Sema4F. En este caso no obtuvimos diferencias significativas en ninguno de los grupos (no se muestran los datos), concluyendo que Sema4F no ejerce su función en diferenciación vía FAK.

CAPÍTULO 3:

Detección y análisis de las isoformas de FAK expresadas preferencialmente en cerebro.

3.1. Detección de las isoformas de FAK mediante Western Blot.

El gen que codifica para FAK, *ptk2*, sufre procesos de *splicing* alternativo que dan lugar a la aparición de diferentes isoformas. Las isoformas se generan por la inserción de pequeños péptidos, o cajas, que presumiblemente cambian la movilidad electroforética de la proteína.

Para determinar si las distintas isoformas se pueden detectar mediante técnicas convencionales de Western Blot, usamos extractos de proteína de varias zonas del cerebro de ratón y revelamos contra FAK total (antiFAK-N, dirigido contra la parte amino-terminal de la proteína FAK). Como podemos observar en la figura 3.1A, FAK se expresa abundantemente en distintas zonas del cerebro durante el desarrollo y también en el adulto. Como control positivo, cargamos dos muestras de lisados de células transfectadas con dos plásmidos de FAK: uno de FAK sin cajas (FAK⁰) y otro de FAK con todas las cajas (FAK^{all}). Como era de esperar, FAK⁰ presenta una mayor movilidad que FAK^{all}, que queda más retenido en el gel. Si estudiamos distintas zonas y estadios de desarrollo del cerebro de ratón, podemos observar que las bandas tienen distinta movilidad, siempre comprendida entre la de FAK⁰ y la de FAK^{all}, indicando que las isoformas mayoritarias en distintas etapas de la ontogenia y zonas del cerebro son las que contienen un número intermedio de cajas.

Para comprobar si efectivamente podemos detectar las distintas isoformas de FAK por WB, transfectamos células HEK293AD con vectores de expresión que contienen una de las isoformas de FAK (FAK⁰, FAK⁺, FAK^{6,7} ó FAK^{all}). Tras lisar las células, inmunoprecipitamos los extractos con el anticuerpo antiFAK-N y revelamos por WB usando el mismo anticuerpo antiFAK-N. Como vemos en la figura 3.1B, todas las distintas isoformas son inmunoprecipitadas con gran especificidad y detectadas por WB.

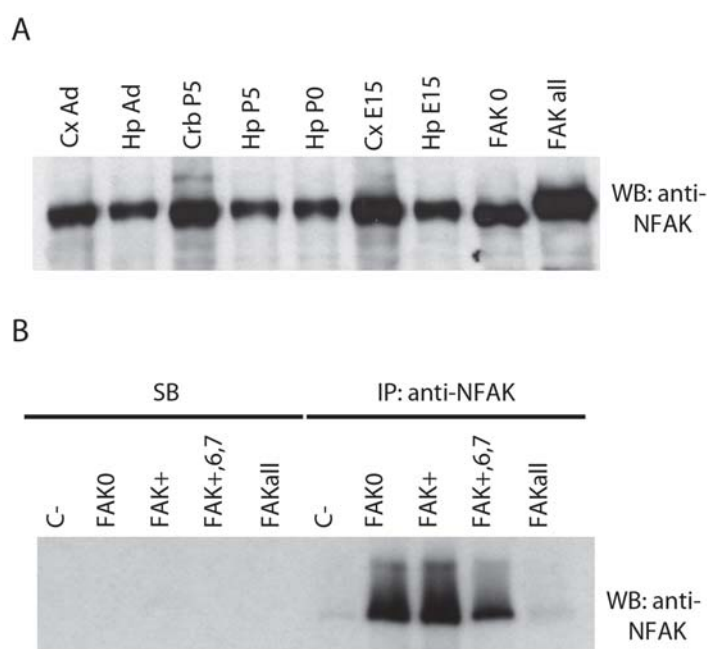


Figura 3.1. Detección de las isoformas de FAK mediante WB. **A**, Expresión diferencial de FAK en distintas áreas del cerebro y a distintas edades (10µg de muestra en cada carril). Se cargaron extractos de células transfectadas con FAK⁰ y FAK^{all} como controles. Se puede apreciar la diferente movilidad de FAK. **B**, Inmunoprecipitación con anti-NFAK de distintas isoformas de FAK transfectadas en células HEK293AD. SB, sobrenadante; IP, inmunoprecipitación; Cx, corteza; Hp, hipocampo; Crb, cerebelo, Ad, adulto, P5, día postnatal 5; E15, día embrionario 15.

3.2. Detección específica de las isoformas de FAK mediante hibridación con sondas radiactivas.

Para profundizar en la distribución de FAK y sus isoformas en el cerebro de ratón, extrajimos el RNA total de muestras de Hipocampo (Hp) y Corteza Entorrinal (EC) de embriones E16 y de adultos. Llevamos a cabo una retrotranscripción para obtener el cDNA, utilizando unos oligonucleótidos diseñados para amplificar FAK completo. Además, usamos una pareja de oligonucleótidos que están dirigidos contra la caja PWR. Con esta combinación de sondas retrotranscribimos y amplificamos sólo el fragmento de FAK (ver Materiales y Métodos).

La combinación de distintas sondas nos permite identificar las diferentes isoformas presentes. Así, las formas de FAK que reconoce cada sonda son:

	FAK ⁰	FAK ⁺	FAK ^{+,6,7}	FAK ^{all}
B28				SI
B6			SI	SI
B7			SI	SI
N+390	SI	SI		
N+393	SI	SI	SI	SI
PWR		SI	SI	SI
NO PWR	SI			

Tabla 3.I. Relación de las sondas utilizadas y las isoformas de FAK que reconoce cada una.

La hibridación de las sondas con las muestras de cerebro arroja varios resultados, obtenidos al cuantificar las bandas que se aprecian en la figura 3.2: En primer lugar, podemos determinar que la forma más común tanto en Hp como en EC es la que presenta las cajas 3, 6 y 7, lo cual es coherente con [116]. Esta isoforma está más representada en el Hp adulto que en el embrionario, mientras que en el caso de EC es más común en el tejido embrionario. En segundo lugar, la isoforma con todas las cajas (FAK^{all}, determinada por la sonda B28), es muy poco común en todos los casos, siendo en el Hp adulto el tejido donde aparece más representada. Por último, las formas sin cajas (FAK⁰) o sólo con la caja PWR (FAK⁺), determinadas por la proporción de sonda N390, son las menos abundantes en los dos tejidos y a las dos edades estudiadas, siendo prácticamente inexistentes.

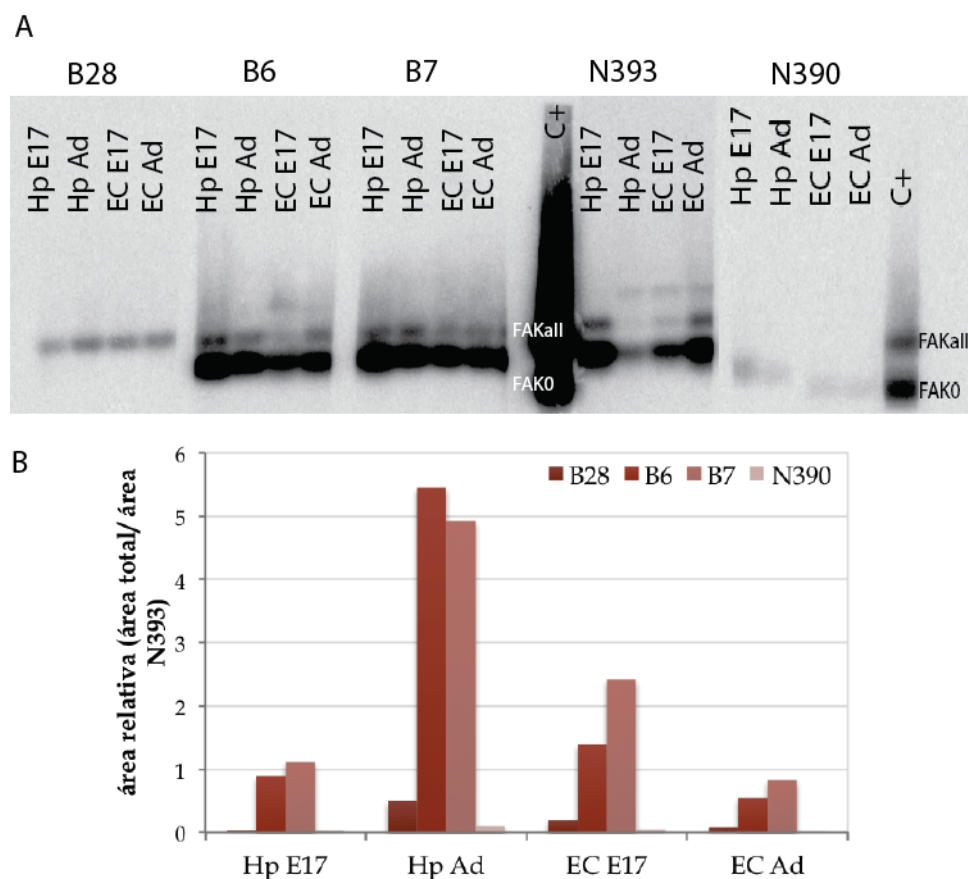


Figura 3.2. Detección de isoformas de FAK en distintas áreas del cerebro y en distintos estadios del desarrollo. Se llevó a cabo una hibridación con sondas específicas para las diferentes cajas. **A**, membrana revelada. **B**, cuantificación de las bandas de A, mediante el programa ImageQuant. *Hp E17*, Hipocampo día embrionario 17; *Hp Ad*, Hipocampo adulto; *EC E17*, Corteza Entorrinal E17; *Ec Ad*, Corteza Entorrinal adulta.

También aplicamos esta metodología a la detección de isoformas de FAK en diferentes tipos celulares del cerebro. Así, obtuvimos RNA de precursores de oligodendrocitos (OPCs) y de astrocitos de cerebro anterior de rata neonatal, y de neuronas de hipocampo de ratón embrionario. Siguiendo el mismo protocolo que en el experimento anterior, obtenemos los datos reflejados en la figura 3.3. En este caso, apreciamos que en los tres tipos celulares las sondas más abundantes son las B6 y B7, que reconocen ambas la isoforma FAK^{+,6,7}. Además, la isoforma FAK^{all} apenas aparece representada. Esto es coherente con lo publicado anteriormente [115, 118] y con nuestros propios resultados anteriores. También de la misma manera que en el experimento anterior, la isoforma sin cajas apenas aparece representada en ninguno de los tres tipos celulares. Aunque hay más cantidad de FAK en OPCs que en astrocitos o neuronas, no parece que haya una diferente distribución de isoformas entre estas células.

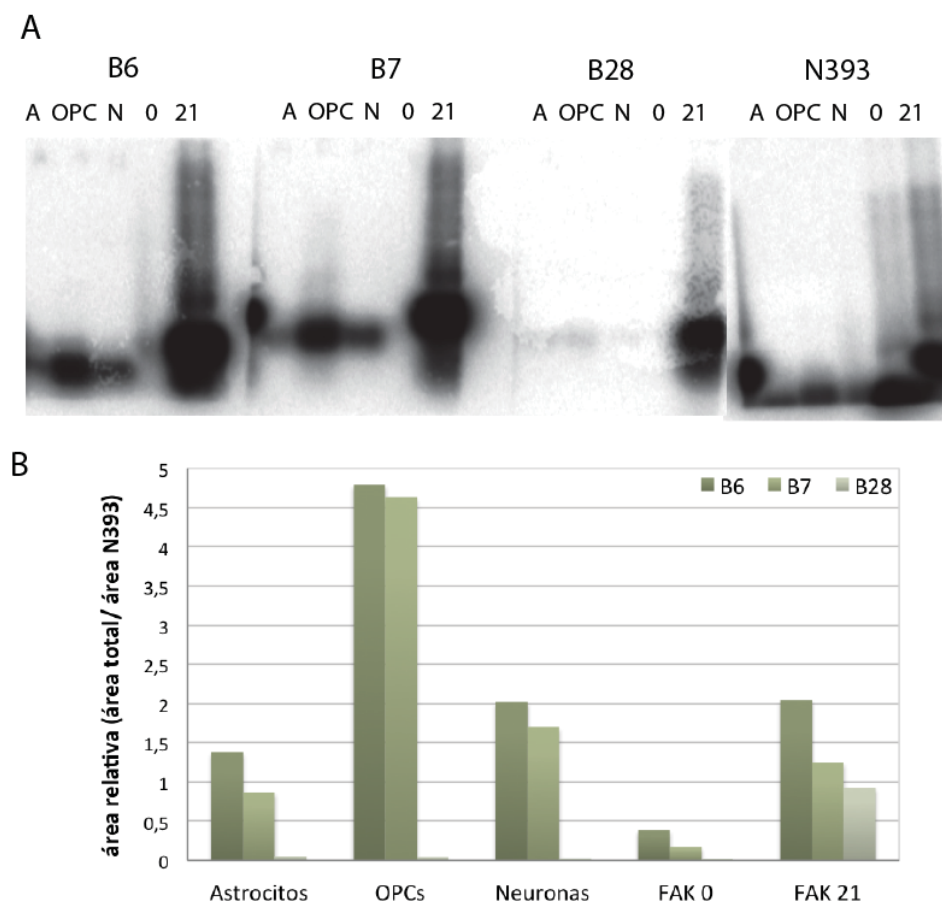


Figura 3.3. Detección de isoformas de FAK en los tres tipos celulares del cerebro mayoritarios. Se llevó a cabo una hibridación con sondas específicas para las diferentes cajas. **A**, membrana revelada. **B**, cuantificación de las bandas, mediante el programa ImageQuant. *A*, astrocytes; *OPC*, precursores de oligodendrocitos; *N*, neuronas; *0*, FAK⁰ (sin cajas); *21*: FAK^{all} (con todas las cajas); *Hp E17*, Hipocampo día embrionario 17; *Hp Ad*, Hipocampo adulto; *EC E17*, Corteza Entorrinal día embrionario 17; *Ec Ad*, Corteza Entorrinal adulto.

Como vemos, la presencia mayoritaria corresponde a las cajas 6 y 7, que indican la presencia de las isoformas FAK^{+,6,7} o FAK^{all}. Es poco probable que la isoforma FAK^{all} sea la mayoritaria puesto que la caja 28 apenas está representada. En conclusión, la isoforma de FAK más abundante en neuronas y células gliales es la que incluye las cajas 3, 6, y 7 (FAK^{+,6,7}).

CAPÍTULO 4:

Estudio de procesos de ramificación axonal:
Papel de FAK y Ack1.

Los procesos de ramificación neurítica son cruciales para el correcto establecimiento de los patrones finales de conectividad del cerebro. Estos procesos están regulados por diferentes vías de señalización. En el laboratorio quisimos profundizar en el análisis de este aspecto del desarrollo neural, hipotetizando que podría existir una interregulación entre las proteínas FAK y Ack1 para controlar la ramificación neuronal. Así, diseñamos una serie de experimentos para comprobar si se regulan mutuamente y de qué manera.

4.1 Estudio de la interacción entre FAK y Ack1.

En primer lugar decidimos comprobar si las dos proteínas interactúan *in vitro*. Para ello, realizamos una serie de cotransfecciones en células HEK293T e inmunoprecipitamos los lisados con anticuerpos anti-Ack1 o anti-FAK. En la figura 4.1A podemos observar que se detecta FAK con el anticuerpo anti-Ack1 y viceversa, confirmando la interacción de estas dos proteínas.

Para determinar una posible región dentro de la proteína Ack1 responsable de la interacción descrita, usamos una serie de construcciones de Ack1 de las que disponíamos, que codifican para formas truncadas de Ack1. De esta manera, realizamos un conjunto de cotransfecciones en células HEK293T de FAK más la forma *full-length* de Ack1 (Ack1FL), Ack1 con el dominio kinasa mutado (Ack1KD) o la parte de Ack1 rica en regiones de prolina (Ack1PR). No observamos cambios en la inmunoprecipitación de FAK con ninguna de estas cotransfecciones (Fig. 4.1B).

Debido a la importante presencia de las distintas isoformas de FAK en el SN, decidimos estudiar si la interacción con Ack1 ocurre de una forma preferente con alguna de estas isoformas. Así, cotransfectamos Ack1FL con FAK⁰, FAK⁺, FAK^{+,6,7} ó FAK^{+,6,7,28} en células HEK293T. Tampoco en esta ocasión observamos una diferente interacción de Ack1 con FAK (Fig. 4.1C), aunque parece que la interacción de Ack1 es más débil con FAK⁰ y más fuerte con FAK⁺.

Por último, y dado que el proceso en el que estamos interesados ocurre en SN, analizamos si la interacción entre FAK y Ack1 sucede también en el cerebro. Para ello inmunoprecipitamos muestras de cerebro con los dos anticuerpos y revelamos con anti-Ack1. Como en el caso de células HEK293T, en la muestra inmunoprecipitada con anti-Ack1 detectamos FAK (Fig. 4.1D), confirmando que la interacción entre FAK y Ack1 también ocurre en cerebro de ratón.

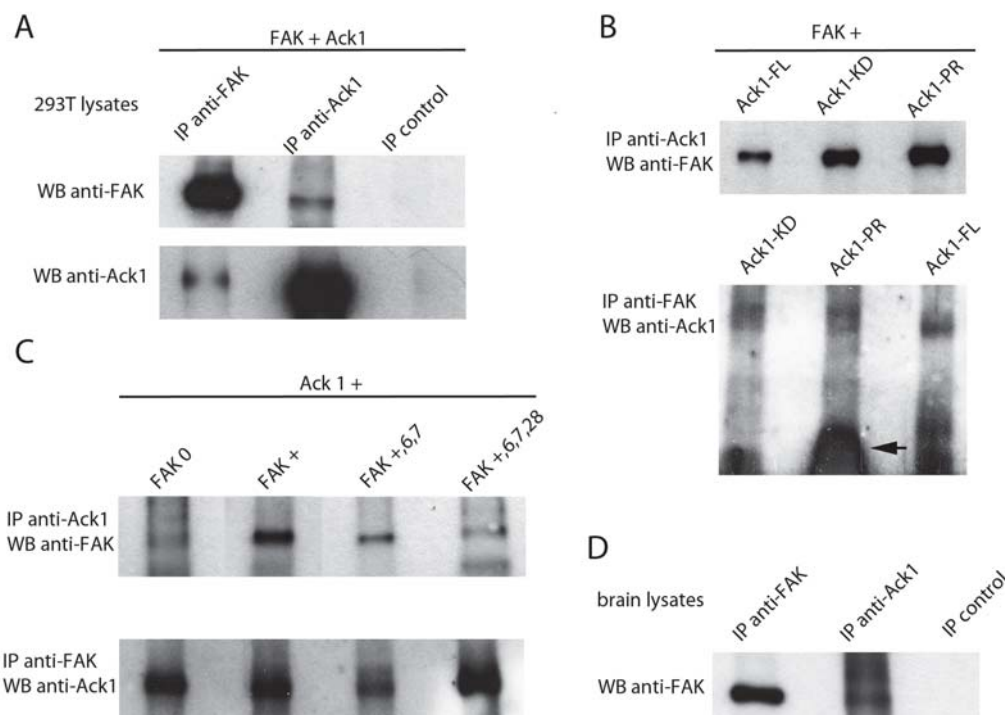


Figura 4.1. Estudio de la interacción entre FAK y Ack1. **A**, muestras de células HEK293T cotransfectadas con FAK y Ack1 y detectadas con anti-FAK o anti-Ack1. **B**, muestras de células HEK293T cotransfectadas con FAK y la forma completa de la proteína Ack1 (*full-length*, Ack1-FL), una forma de Ack1 con el dominio kinasa mutado (Ack1-KD) o la región rica en prolinas de Ack1 (Ack1-PR), detectadas con anti-FAK o anti-Ack1. La flecha indica la forma Ack1-PR, cuyo peso molecular es de 50 KDa. **C**, lisados de células HEK293T cotransfectadas con Ack1 más la isoforma de FAK sin cajas (FAK0), con la caja PWR (FAK+), con las cajas PWR, 6 y 7 (FAK +,6,7) o con todas las cajas (FAK +,6,7,28), y detectados con anti-FAK y anti-Ack1. **D**, lisados de cerebro de ratón inmunoprecipitados con FAK ó Ack1 y detectados con anti-FAK.

Para visualizar la interacción de FAK y Ack1 detectada por WB realizamos una inmunocitoquímica en neuronas de hipocampo de ratón E16 contra ambas proteínas, observando una buena colocalización (Fig. 4.2.).

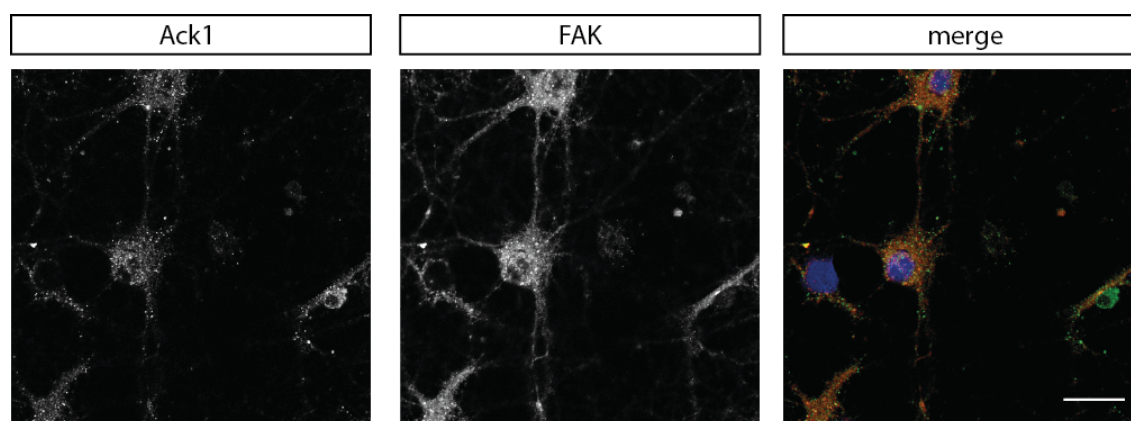


Figura 4.2. Inmunodetección de FAK y Ack1 en neuronas. Los paneles muestran imágenes de microscopía confocal de ICC en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón E16 tras 7d.i.v. revelada con Ack1 (verde en *merge*) y FAK (rojo en *merge*). Barra de escala: 20μm.

4.2. Análisis de la fosforilación de FAK y Ack1.

Para estudiar si las dos kinasas se regulan mutuamente en neuronas, decidimos analizar el efecto del silenciamiento de una de ellas sobre el estado de fosforilación de la otra. Para ello diseñamos dos estrategias, utilizando como modelo experimental cultivos primarios de hipocampo de ratón:

En primer lugar, infectamos las neuronas con lentivirus que expresan un shRNA para silenciar Ack1 (sh50 Ack1) o un shRNA control (*scrambled*, scAck1. Ver sección 4.4 y Fig. 4.6 y Material y Métodos). Después de 6 días *in vitro* (d.i.v.), tiempo suficiente para disminuir la expresión de Ack1, analizamos por WB el grado de fosforilación en tirosinas de FAK en los inmunoprecipitados. Pudimos observar, como se muestra en la figura 4.3, que la estimulación de la actividad kinasa con $H_2O_2 + Na_3VO_4$ provoca un incremento en la fosforilación de FAK en neuronas control, mientras que este incremento no sucede en el caso de neuronas en las que se ha silenciado Ack1. Estos resultados indican que Ack1 debe estar funcional para que tenga lugar la activación de FAK.

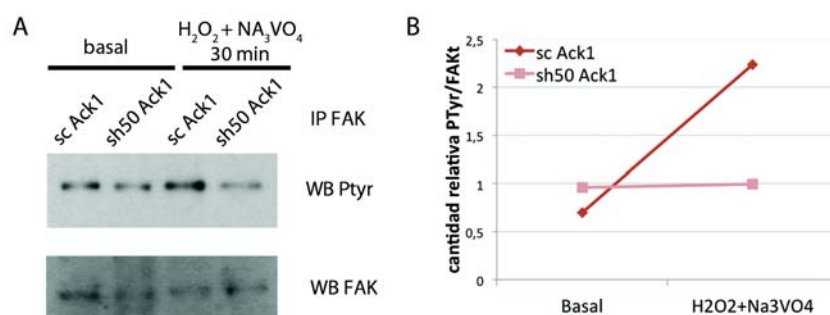


Figura 4.3. Estudio de la fosforilación de FAK. **A**, Las neuronas de hipocampo se infectaron con lentivirus que expresan un shRNA scrambled (pDSL-sc) o un shRNA para silenciar Ack1 (pDSL-sh50). Después se trataron con $H_2O_2 + Na_3VO_4$ durante 30 minutos y se lisaron. Se inmunoprecipitaron con anti-FAK y se analizaron por WB con los anticuerpos anti-Ptyr o anti-FAK. **B**, Cuantificación de las bandas en A, normalizando respecto a la cantidad total de FAK.

Por otro lado, pre-tratamos los cultivos primarios con el inhibidor de FAK (PF-228, ver capítulo 2 y Material y Métodos) o con DMSO. Las muestras inmunoprecipitadas con anti-Ack1 fueron analizadas para cambios en la fosforilación en tirosinas de la proteína por WB. Los resultados muestran que en condiciones basales (sin estimulación) tiene lugar un incremento en la fosforilación de Ack1 cuando FAK está inhibido. Al estimular la fosforilación de Ack1 con $H_2O_2 + Na_3VO_4$ o BDNF (un activador fisiológico de Ack1) en cultivos tratados con PF-228 podemos ver que no cambia la fosforilación de Ack1 respecto a la condición basal o incluso disminuye (Fig. 4.4). En conjunto, estos resultados indican que Ack1 no responde a sus estímulos cuando FAK se encuentra inactiva.

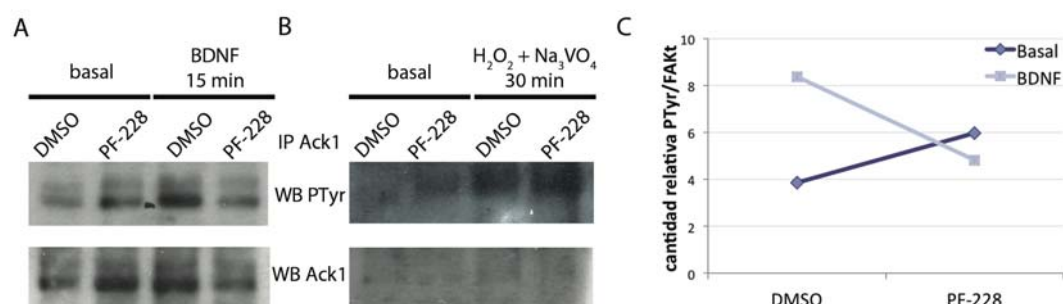


Figura 4.4. Estudio de la fosforilación de Ack1. Las neuronas de hipocampo se trataron con DMSO o con el inhibidor de FAK PF-228 durante 1h, y después con medio control (basal), BDNF (15 minutos) (**A**), que induce la fosforilación de Ack1, o bien con $H_2O_2 + Na_3VO_4$ (30 minutos) (**B**), que provoca una estimulación indiscriminada de kinasas celulares. Las muestras se inmunoprecipitaron con anti-Ack1 (IP Ack1) y se resolvieron por SDS-PAGE + WB, revelando con anticuerpos anti-fosfotirosina (WB PTyr) o anti-Ack1 para ver la cantidad de proteína total (WB Ack1). **C**, cuantificación de las bandas de las muestras tratadas con BDNF en A, normalizadas respecto a la cantidad total de Ack1.

4.3. Tratamientos de cultivos primarios de hipocampo con netrina 1.

La netrina 1 (Net-1) es una proteína secretable con importantes funciones en guía axonal y ramificación neurítica. FAK se encuentra controlando algunos de los efectos de Net-1, incluidos la atracción del cono de crecimiento, el crecimiento del axón y la migración neuronal [130-132]. Así, quisimos comprobar si Ack1 también responde a Net-1 y de qué manera. Para ello, pre-tratamos cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón embrionario con el inhibidor de FAK (PF-228, ver Material y Métodos y capítulo 2) o con un inhibidor de tirosina kinasas (genisteína) y sus correspondientes controles. Posteriormente, estas mismas células se trataron con medio control o medio condicionado Net-1 durante 5 minutos, y analizamos el estado de fosforilación. Los resultados, mostrados en la figura 4.5, muestran un incremento de la fosforilación de FAK en respuesta a netrina, especialmente prominente cuando se pretratan las neuronas con PF-228. En el caso de Ack1, vemos que también hay un incremento en su fosforilación en respuesta a netrina sólo cuando las neuronas se pretratan con el inhibidor genisteína.

En resumen, tanto FAK como Ack1 responden específicamente al tratamiento con netrina mediante un incremento en su fosforilación.

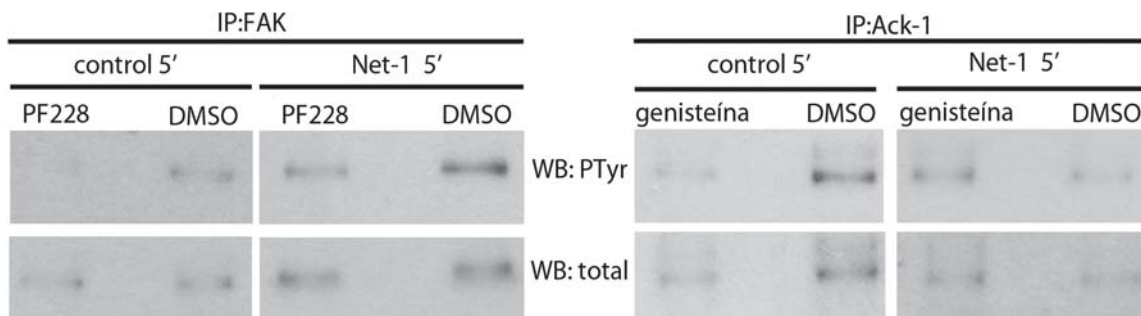


Figura 4.5. Respuesta a Net-1 de FAK y Ack1. “WB: PTyr” indica que la membrana se ha revelado con un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas y “WB:total” que se reveló con antiFAK (paneles de la izquierda) o con antiAck1 (paneles de la derecha).

4.4. Explantes de Hipocampo electroporados con shAck.

A continuación, decidimos analizar un modelo más cercano a lo que sucede fisiológicamente en el organismo. Para ello, estudiamos el efecto de la inhibición de Ack1 en explantes de hipocampo expuestos a una fuente de Net-1. En el caso de FAK, ya se ha descrito previamente en la bibliografía su papel en respuesta a Net-1 (ver Introducción y [130-132]).

Para inhibir Ack1 dispusimos de dos RNA de interferencia (shRNAs) contra el gen correspondiente (ver Material y Métodos). En primer lugar comprobamos que los shRNAs efectivamente disminuyen la expresión de la proteína. Así, transfectamos cultivos primarios de neuronas de hipocampo y estudiamos el patrón de expresión de la proteína Ack1 en neuronas transfectadas con las diferentes construcciones respecto a neuronas transfectadas con el mismo vector pero incluyendo una secuencia aleatoria de RNA (*scrambled*: scAck1). En la figura 4.6 se puede apreciar la disminución de la inmunofluorescencia en neuronas transfectadas con sh50RNA Ack1. Esta

construcción es la que mejor funcionó de modo que fue la que elegimos para llevar a cabo el resto de nuestros experimentos.

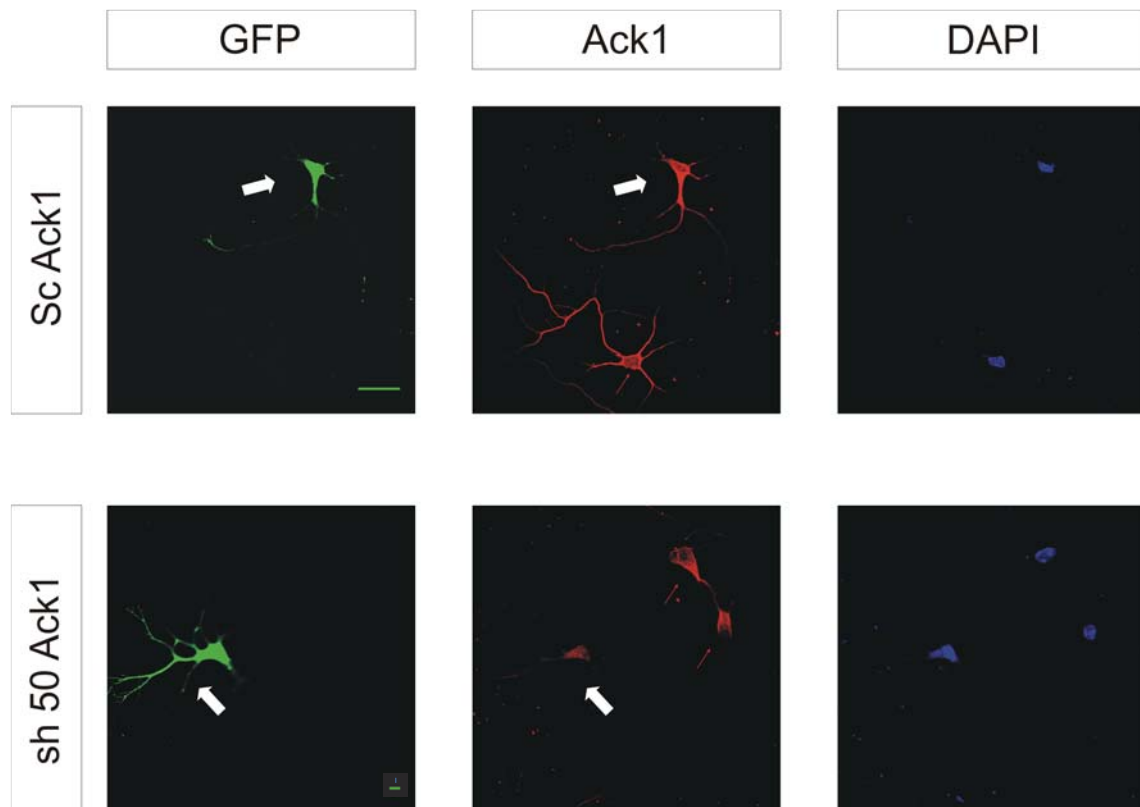
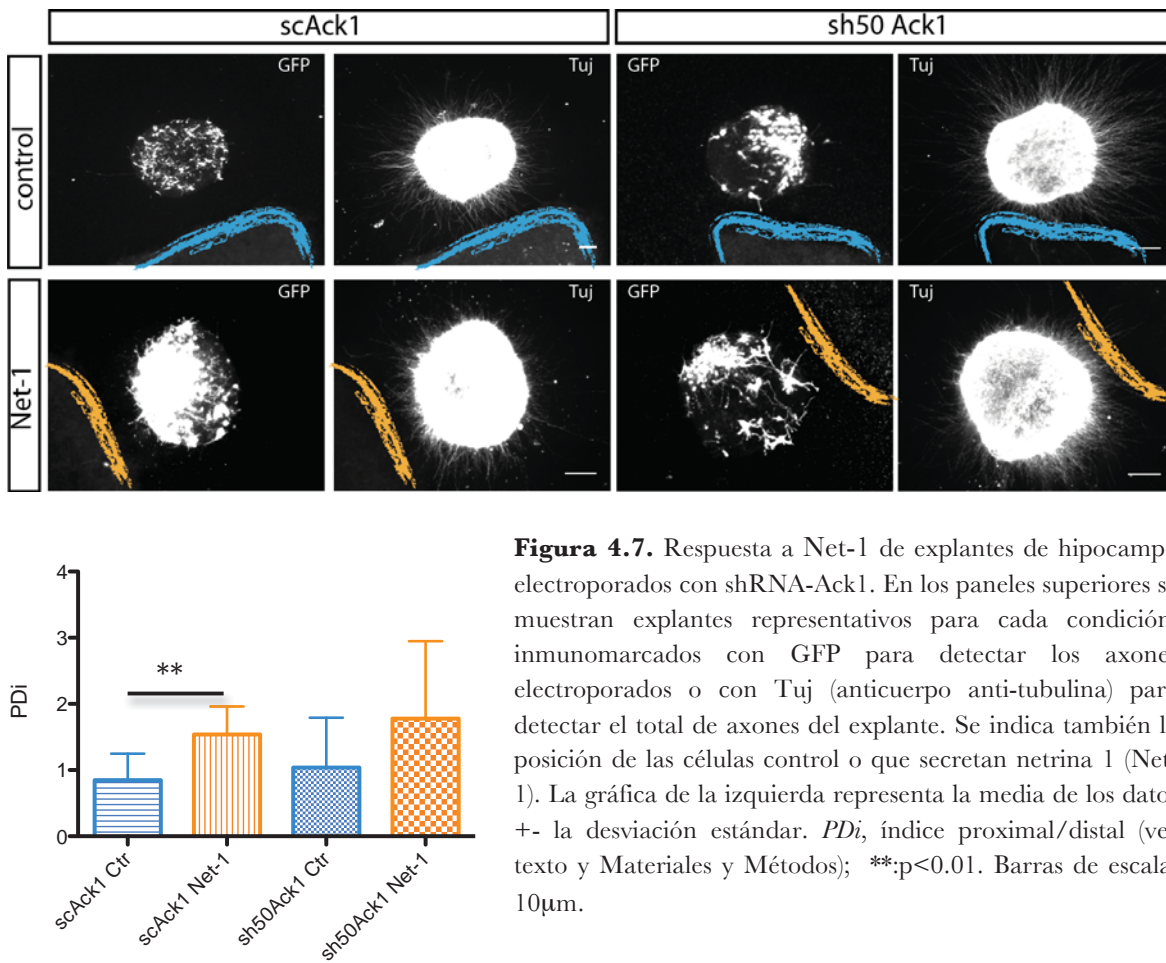


Figura 4.6. Análisis de la represión de Ack1 por el silenciamiento de sh50Ack1 en neuronas de hipocampo. Las flechas blancas indican las células en las que se observa cómo la expresión del vector de silenciamiento (fluorescencia en verde) repercute en una menor fluorescencia de Ack1 (rojo). Las flechas pequeñas rojas indican otras células de Ack1, no transfectadas con el vector de silenciamiento y que por tanto conservan la expresión de Ack1. Barras de escala: 20µm.

Una vez confirmada la inhibición de la expresión de Ack1 por sus shRNAs, pasamos a reducir su expresión en explantes de hipocampo. Los explantes, electroporados con un shRNA (sh50 Ack1) o con un shRNA control (GFP ó *scrambled*: scAck1), se enfrentaron a células que expresan Net-1, y se contó, de manera semi-automática, el número de axones electroporados que se veían atraídos hacia la fuente de netrina, expresado con el parámetro PDi (*proximal-to-distal index*). Este parámetro se obtiene a partir del número de axones de la parte proximal (P) respecto al número de axones de la parte distal (D) del explante, y es una medida de la atracción del explante.

Los resultados muestran que los explantes de hipocampo electroporados con un RNA control presentan atracción hacia la fuente de netrina, como se puede ver en la figura 4.7 ($p=0.0062$). En cambio, cuando las neuronas se electroporan con un shRNA para Ack1 la atracción deja de ser significativa estadísticamente ($p=0.0649$), aunque se observa una tendencia. Este resultado indica que Ack1 es necesario para la atracción ejercida por netrina 1.



Durante el análisis de estos experimentos observamos que la longitud de los axones electroporados con sh50 Ack1 era menor que en el caso de la electroporación con scAck1; por tanto, decidimos cuantificar la longitud total de todos los axones que salen de los explantes así como la longitud de los axones de la mitad proximal a la fuente de células, que es otra medida de atracción. Los resultados representados en la figura 4.8 muestran que los axones proximales de explantes control son significativamente más largos en presencia de netrina ($p=0.0175$, Fig. 4.8A y B). Este incremento en la longitud axonal en respuesta a Net-1 no sucede cuando los explantes se han electroporado con sh50 Ack1. En la figura 4.8C se muestra, además, que la electroporación de neuronas con shAck1 *per se* provoca que la longitud axonal sea menor que en el control, independientemente de que haya o no netrina ($p=0.0057$).

En resumen, podemos concluir que la inhibición de la función de Ack1 tiene dos efectos en neuronas de hipocampo: por un lado los axones de neuronas sin Ack1 son más pequeños que en el control, y por otro lado los axones sin Ack1 no responden a Net-1 con un incremento en su longitud, como en el caso del control.

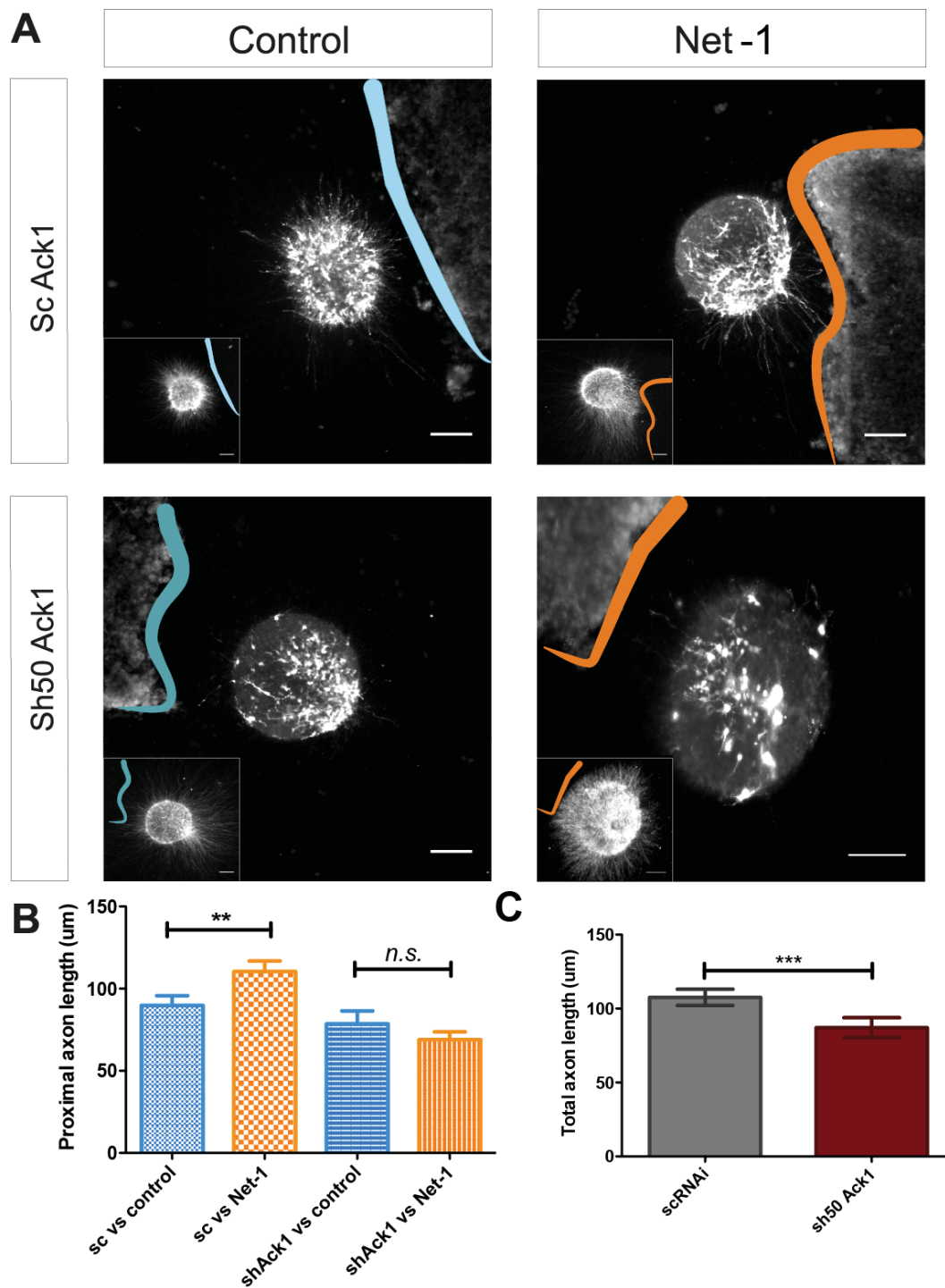


Figura 4.8. Medida de la longitud axonal en respuesta a Net-1. **A**, Fotos representativas de explantes de hipocampo electroporados con scAck1 (control) o con sh50Ack1 y enfrentados a células control o que secretan Net-1. La foto grande corresponde a las neuronas electroporadas, detectadas por inmunofluorescencia GFP, mientras que el recuadro pequeño muestra el explante completo inmunodetectado con anti-tuj-1. **B**, Cuantificación de la longitud de los axones electroporados de la mitad proximal del explante, para las 4 condiciones mostradas en A. **C**, Cuantificación de la longitud total de los axones electroporados con un RNAi control (scRNAi) o contra Ack1 (sh50Ack1). Las barras representan la media de los datos \pm el error estándar de la media (SEM). **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; *n.s.*: diferencia estadísticamente no significativa. Barras de escala en A: 100 μ m.

CAPÍTULO 5:

Estudio de las fosforilaciones de FAK y Ack1
mediante Espectrometría de Masas (MS).

5.1. Detección de proteínas que interaccionan con FAK y Ack1 por MS

La técnica de MS permite identificar todas las proteínas presentes en una muestra. Se basa en la ionización de la muestra y la aplicación de un campo magnético que desvía los átomos presentes en mayor o menor grado según su masa y su carga. Nosotros aplicamos esta técnica a muestras enriquecidas en FAK o Ack1 mediante inmunoprecipitación, a partir de cerebros de ratón.

Después de poner a punto las condiciones experimentales, llevamos a cabo varios experimentos utilizando tres tipos de muestras: cerebro de ratón OF-1 en desarrollo (“P5”), cerebro de ratón OF-1 adulto control (“control”) y cerebro de ratón OF-1 adulto epiléptico (“PTZ”). Las crisis epilépticas se consiguieron mediante la inyección de pentilentetrazol (PTZ), una conocida droga epileptogénica que actúa inhibiendo los receptores GABAérgicos [176, 177]. El estadio del cerebro en desarrollo se eligió a P5, por ser un momento de reordenación sináptica y refinamiento de las conexiones.

En la figura 5.1 se muestra un espectro modelo de un péptido fosforilado, en este caso del péptido que incluye la fosforilación de la tirosina 925 de FAK.

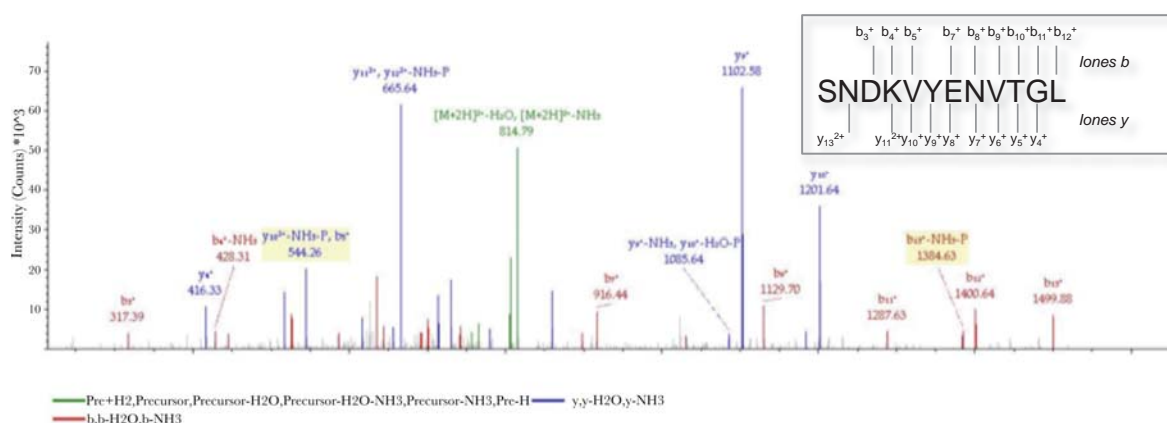
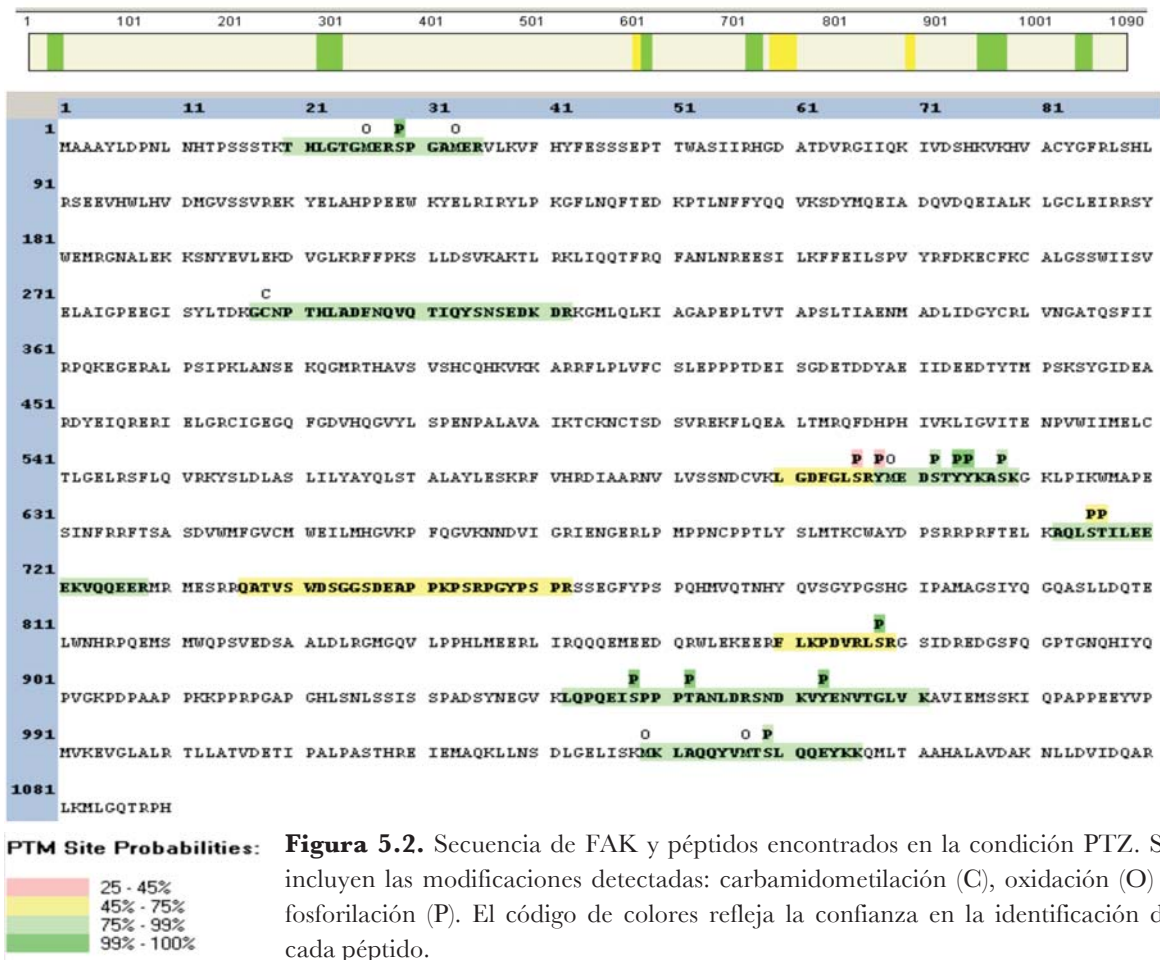


Figura 5.1. Espectro obtenido para el péptido SNDKVYENVTLGLVK, e identificación de la fosforilación de la tirosina Y925. El péptido se ha detectado con carga 2+ como m/z 823.39Da. Con el tipo de fragmentación usada se generan mayoritariamente iones Y y B. En el recuadro se muestran los iones obtenidos. La asignación de iones a partir de y6+ demuestra que el péptido se encuentra fosforilado.

En la figura 5.2 se muestra, sobre la secuencia de FAK, los péptidos encontrados y las modificaciones asociadas a ellos, información obtenida a partir de los espectros como el de la figura 5.1.



Los resultados obtenidos se resumen en las tablas del Anexo 1. En dichas tablas las 20 primeras proteínas encontradas en cada caso están ordenadas de mayor a menor *score*, un parámetro del programa de análisis que refleja la fiabilidad de la detección de cada proteína basada en la suma de los *scores* de cada uno de los péptidos detectados. El *coverage* o cobertura denota el porcentaje de la proteína identificado. También se muestran el número de proteínas encontradas y el número de péptidos únicos a cada proteína que se ha identificado.

En el caso de la inmunoprecipitación con anti-FAK, la proteína más representada es FAK, validando de esta manera la técnica. Además, la lista total de proteínas encontradas muestra otras proteínas interesantes (tablas A.I y A.II).

En el caso de la inmunoprecipitación con Ack1 la técnica de purificación no es tan eficiente de modo que no conseguimos la cantidad adecuada de proteína para su detección y para la detección de su fosforilación en todos los casos. Los datos por tanto no son tan concluyentes y estamos trabajando para obtener una mayor cantidad de proteína y así poder detectar Ack1. En el Anexo 1 (tablas A.III y A.IV) se pueden observar los datos preliminares obtenidos. Como vemos, sólo en el caso de las muestras P5 y PTZ se detecta Ack1, y con unos valores de *score* y *coverage* muy inferiores al caso de FAK. En otro experimento paralelo hemos encontrado la proteína Ack1 también en individuos control.

En la tabla 5.I podemos ver las proteínas que se detallan a continuación, que son las que juegan un papel más importante en el SN, así como su presencia/ausencia en las distintas condiciones

estudiadas. Parece que mientras que en el caso de FAK se mantienen las proteínas encontradas entre las condiciones control y PTZ, en el caso de Ack1 se observan mayores diferencias en estas dos condiciones.

Nombre	Código	FAK			Ack1		
		P5	Control	PTZ	P5	Control	PTZ
Drebrina	Q9QXS6	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
CaMKII-α	P11798	No	No	No	No	Sí	Sí
Amfifisina	Q7TQF7	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí
β-adducina	Q9QYB8	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Neurabina2/Espinofilina	Q6R891	Sí	No	No	No	No	Sí
SAPAP1	O14490	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí
SAPAP2	Q8BJ42	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
SAPAP3	Q6PFD5	No	Sí	Sí	No	Sí	No
SynGAP	Q9QUH6	No	Sí	Sí	No	Sí	No
NCAM	P13596	Sí	No	No	No	No	Sí
α-catenina	Q61301	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
β-espectrina	Q62261	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Neuroliquina-3	Q8BYM5	No	No	No	Sí	Sí	No
Sinaptopodina	Q8CC35	No	No	No	No	Sí	Sí
Sinapsina I	O88935	No	No	No	No	Sí	Sí
Begain	Q68EF6	No	No	No	No	Sí	No
Grin1	Q3UNH4	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Nemitina	Q8CGF6	Sí	Sí	No	No	Sí	No
Pap	Q7SIG6	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No
srGAP2	Q91Z67	Sí	No	No	Sí	No	No

Tabla 5.I. Selección de las principales proteínas encontradas en los experimentos de MS. Se muestran algunas proteínas implicadas en procesos importantes en el SN y que se han encontrado interaccionan con FAK y/o Ack1. Se indica su código de acceso en la base de datos UniProt y su presencia/ ausencia en las tres condiciones analizadas.

DREBRINA: La drebrina es una proteína de unión a actina muy enriquecida en el cerebro, y localizada exclusivamente en espinas dendríticas (no en axones ni en tronco dendrítico). La drebrina no modifica directamente la polimerización/despolimerización de actina sino que compete por la unión a los microfilamentos con otras proteínas de unión a actina, como α -actinina. Existen 2 isoformas de drebrina, originadas por *splicing* alternativo a partir de un único gen: drebrina-E, expresada durante el período embrionario, y drebrina-A, que incluye un exón más y se expresa específicamente en el SN adulto. Contienen un dominio de unión a actina y un dominio de unión a homer, una de las proteínas que forma parte del macrocomplejo de densidad postsináptica. La drebrina-A se localiza en las sinapsis y regula la agrupación de PSD-95, primer paso en la formación de espinas. La sobreexpresión de drebrina en neuronas de hipocampo da lugar a la desestabilización de las espinas maduras, que se transforman en filopodios anormalmente largos; esto supone la pérdida de contactos sinápticos, promoviendo su plasticidad. Este proceso es dependiente de la activación de Ras. Además, se ha identificado la drebrina como un componente fundamental en la formación del *leading process* durante la migración tangencial neuronal. El ratón deficiente en drebrina-A presenta defectos en memoria y funciones cognitivas, y se ha visto que su expresión disminuye en pacientes con Alzheimer y con síndrome de Down [178-183].

CAMKII- α (subunidad α de la kinasa II dependiente de calcio y calmodulina): Es una de las proteínas más abundantes del cerebro. Existen aproximadamente 28 isoformas generadas a partir de *splicing* alternativo de cuatro genes (α , β , γ , δ). La subunidad α y la subunidad β coexisten en el cerebro, donde interaccionan formando heterolígomeros. La subunidad β presenta un dominio de

interacción con actina (ABD) del cual carece la subunidad α . La proteína, además de unirse al citoesqueleto de actina, actúa como una quina serina/treonina, pero para ello necesita altas concentraciones de calcio y calmodulina. Esto se consigue con la activación de receptores de glutamato, que induce la localización de la CaMKII en la PSD así como su autofosforilación y permanente activación. Una vez activa, puede modular el citoesqueleto de actina de las dendritas mediante activación de diversas proteínas RhoGEFs ó Rac1GEFs. También puede actuar vía SynGAP o induciendo la fosforilación y activación de la neurabina-2/espinofilina. Indirectamente, permite la unión de drebrina a F-actina. Estas vías de señalización dan lugar a una remodelación del citoesqueleto de actina que permite la estabilización de las espinas dendríticas. Este proceso es la base de la potenciación a largo plazo (LTP), y de hecho está demostrado que la CaMKII es necesaria y suficiente para inducir LTP: la inducción de LTP provoca la entrada de calcio y la subsiguiente activación de CaMKII, que se transloca a la sinapsis donde se une a receptores NMDA y produce la potenciación mediante la fosforilación de receptores AMPA [184-186].

AMFIFISINA: Es una familia de proteínas implicadas en procesos de endocitosis y ensamblaje del citoesqueleto. Concretamente, participan en el proceso de endocitosis de vesículas sinápticas. Tras la despolarización del terminal nervioso, el aumento de la concentración de calcio activa la fosfatasa calcineurina, la cual desfosforila la amfifisina que se encuentra constitutivamente fosforilada. Tiene varios sitios de fosforilación por Cdk5, MAPK1, caseína quina 2 (CK2) y Dyrk1/quina *minibrain*. Además, interacciona con varias proteínas como clatrina, dinamina, sinaptotagmina y endofilina. En terminales nerviosos, las amfifisinas se asocian con FAK, y esta interacción podría contribuir a la distribución subcelular de amfifisinas y a su papel en endocitosis. Es interesante resaltar que la interacción es más fuerte con las isoformas FAK⁺ y FAK^{+,6,7} que con FAK⁰ [120, 187, 188].

β -ADDUCINA: Existen 3 clases de adducinas, α , β y γ . De ellas, las de clase β están enriquecidas en cerebro, concretamente en el cono de crecimiento y en espinas dendríticas. El ratón deficiente para β -adducina tiene una tasa mayor de recambio de sinapsis y espinas dendríticas, que se traduce en una pérdida de la estabilización de sinapsis, y presenta defectos en potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD, respectivamente). Se trata una proteína de unión a actina con actividad *capping*, es decir, controla la polimerización de filamentos de actina mediante su unión al extremo +. Promueve la interacción de actina con espectrina, una proteína de citoesqueleto. Su actividad de *capping* y su unión a espectrina se ven inhibidas por fosforilación por PKC. Su actividad también puede ser modificada por PKA, Rho quina, Fyn y la quina dependiente de calcio-calmodulina CaMK [189].

NEURABINA-2/ESPINOFILINA: Esta proteína, que se localiza en espinas dendríticas, modula la transmisión sináptica excitatoria y la morfología de las espinas. El fenotipo del ratón deficiente en espinofilina muestra un incremento en la densidad de espinas dendríticas. La localización de la espinofilina en las espinas tiene lugar mediante su unión al citoesqueleto de actina, gracias a su dominio de unión a actina ABD. Esta unión se inhibe por fosforilación de PKA (en el residuo S94), CamKII (en S100, S116) o ERK1/2 (en S15). La activación de los receptores de glutamato provoca la fosforilación de ERK2, y su activación provoca la fosforilación de espinofilina lo cual la separa de actina, y por tanto permite la remodelación del citoesqueleto de actina de la espina dendrítica. Por otro lado, la interacción de espinofilina con la proteína-fosfatasa 1 (PP1) la recluta a la densidad postsináptica (PSD), donde puede desfosforilar los receptores de glutamato, y así proporcionar un mecanismo de finalización de la transmisión sináptica [190, 191].

SAPAPS (familia de proteínas asociadas a SAP90/PSD95; proteínas asociadas a dominios guanilato ciclasa –GKAP-; o proteínas asociadas a *discs-large-DAP*): Existen 4 genes de esta familia de proteínas (SAPAP1-4), que interacciona directamente con la proteína PSD95. Su expresión se regula diferencialmente en SNP y SNC. Se localizan, además de en sinapsis glutamatérgicas, en sinapsis colinérgicas. SAPAP1, 2, y 4 se expresan en cuerpos celulares mientras que SAPAP3 se encuentra en dendritas. Forman parte del complejo de andamiaje de la densidad postsináptica, proporcionando un nexo de unión entre PSD95 y el citoesqueleto de actina a través de interacciones con proteínas shank, que a su vez se unen a la proteína de unión a actina cortactina. Además, shank se une a homer, que interacciona con los receptores metabotrópicos de glutamato. Así, el modelo actual de andamiaje tiene en las interacciones PSD95-SAPAP-shank un componente crucial organizador del gran complejo postsináptico de las sinapsis glutamatérgicas [192, 193].

SYNGAP (proteína activadora de RasGTPasa): Se expresa selectivamente en cerebro, y está enriquecida en sinapsis excitatorias donde interacciona con CaMKII, PSD95, SAP102 y receptores NMDA. Actúa induciendo la actividad GTPasa de Ras, y por tanto inhibiéndola. La activación de receptores NMDA provoca un aumento de la concentración de calcio, lo cual activa a la proteína CaMKII que fosforila a SynGAP, inhibiéndola. De este modo, Ras permanece activa y inicia la vía de señalización de MAPK. SynGAP además es un potente regulador negativo de la transmisión sináptica y del tráfico de receptores AMPA a la membrana, así como del crecimiento de espinas dendríticas [193-196].

NCAM (molécula de adhesión neural): Es una proteína transmembranal que forma parte de la superfamilia Ig de moléculas de adhesión. Existen tres isoformas mayoritarias originadas mediante *splicing* alternativo a partir de un único gen. Está implicada en múltiples funciones como por ejemplo migración neuronal, crecimiento neurítico y sinaptogénesis. Estas respuestas se dan mediante la unión homofilica o heterofilica de NCAM al factor de crecimiento fibroblástico (FGF) o al factor neurotrófico derivado de glía (GDNF). NCAM también interacciona con receptores de glutamato (AMPA y NMDA) y de neurotrofinas (p75). La activación de la señalización de NCAM depende de su localización en *lipid rafts*. Su función en neuritogénesis requiere la activación de la quinasa Fyn, la cual actúa activando FAK, que es imprescindible para esta función de NCAM. La activación de FAK depende de la unión de calmodulina a NCAM. NCAM presenta una modificación postraducciona poco frecuente en mamíferos: la polisialización (PSA). La PSA-NCAM regula la migración y la diferenciación celular durante el desarrollo del cerebro, mientras que en el adulto se asocia a neurogénesis y plasticidad sináptica, expresándose sólo en zonas de alta plasticidad como el hipocampo. La PSA-NCAM se encuentra también en células madre neurales que dan lugar a diferentes precursores y progenitores celulares, incluyendo oligodendrocitos, células precursoras de astrocitos, astroblastos, neuroblastos y precursores gliales [153, 197].

α -2-CATENINA (α -N-catenina): Se expresa ampliamente en el sistema nervioso. Está implicada en la modulación de la morfología de las espinas dendríticas y en la migración axonal. Actúa como un nexo de unión entre la adhesión celular y el citoesqueleto de actina: las cadherinas se unen a un complejo de α - y β -cateninas, y la α -catenina se une a la actina, como parte del proceso de remodelación sináptica. Así, están implicadas en la formación de espinas dendríticas. De hecho, la sobreexpresión de α -catenina provoca un aumento en la densidad de espinas y sinapsis, mientras que su ausencia aumenta la movilidad de las “cabezas” de las espinas y la ratio de protrusión de filopodios [198-200].

β -ESPECTRINA (fodrina): Se descubrió en eritrocitos, pero también está presente en muchos otros tipos celulares, incluidas las neuronas. Es el principal componente del esqueleto de la membrana celular, y es responsable de mantener la estabilidad de la membrana, regular la morfología celular y limitar la difusión lateral de las proteínas integrales de membrana, organizando microdominios membranales. Actúa entrecruzando los filamentos de actina, y además de con actina interacciona con otras proteínas como ankirina, adducina, sinapsina y proteína 4.1. Interacciona específicamente con NCAM (ver más abajo), formando un complejo que incluye la proteína quinasa C (PKC), y que es esencial para neuritogénesis y la formación y mantenimiento de la PSD. También tiene sitios de unión a homer, otra proteína con función de andamiaje de la PSD; a la proteína calmodulina, con la que interactúa de manera dependiente de calcio; y a CaMKII y a las repeticiones ankirina de la familia de proteínas shank, que forman parte del engranaje de la PSD [193, 201, 202].

NEUROLIGUINA-3: Forma parte de una familia de proteínas de adhesión, las neuroliginas, que interaccionan con las neurexinas. Se trata de proteínas transmembranales tipo-I. Existen tres miembros de neuroligina en ratón; la neuroligina-1 (NL-1) se encuentra en sinapsis glutamatérgicas, la NL-2 en GABA-érgicas y la NL-3 en ambas. El complejo neurexina-neuroligina se une a CASK por el lado de neurexina y a PSD-95 por el lado de neuroligina. Se cree que este complejo participa en la formación de sinapsis, aunque no en los pasos iniciales ya que el triple mutante NL1-3 no presenta cambios en el número de contactos sinápticos. Su función no está clara aún, aunque parece que el complejo neurexina-neuroligina tiene un papel más importante en señalización que en adhesión [203-205].

SINAPTOPODINA: Es una proteína que se asocia a actina mediante interacción con α -actinina y que está implicada en la movilidad de las espinas dendríticas. Se expresa en los podocitos de riñón y en el cerebro, donde se encuentra selectivamente en el cuello de un subgrupo de espinas maduras del telencéfalo, aunque su mRNA se expresa también en otras áreas de gran plasticidad sináptica. El ratón deficiente en sinaptopodina no muestra cambios en la densidad y longitud de espinas dendríticas corticales pero en cambio sí una completa ausencia del aparato de espinas (*spine apparatus*) en neuronas del telencéfalo. El aparato de espinas, típico de neuronas telencefálicas, está formado por dos elementos, retículo endoplasmático liso y placas electrodensas, y se desconoce su función aunque se postula que está implicado en almacenamiento de calcio, pudiendo participar por tanto en plasticidad sináptica y síntesis proteica. En el hipocampo, tampoco se ha visto un cambio en el número ni longitud de las espinas dendríticas de neuronas piramidales, pero sí una importante disminución del tamaño de la “cabeza” [206-208].

SINAPSINA-I: La familia de sinapsinas está compuesta por cuatro miembros (Ia, Ib, IIa y IIb). Se expresan en la membrana de las vesículas sinápticas, y están implicadas en el proceso de exocitosis del neurotransmisor: las vesículas del *pool* de reserva de las neuronas se encuentran ancladas al citoesqueleto por interacción de las sinapsinas con actina y otros componentes del citoesqueleto. El aumento de la concentración intracelular de calcio provocado por la despolarización neuronal activa la proteína CaMKII, que fosforila la sinapsina y entonces deja de interactuar con el citoesqueleto. Esto hace que la vesícula sináptica pueda moverse a la zona activa [209].

BEGAIN (proteína enriquecida en cerebro asociada a guanilato kinasa –GK-): Descubierta en 1998 mediante un ensayo de doble híbrido usando el dominio GK de PSD95, se trata de una proteína muy enriquecida en cerebro, donde aparece en núcleo y dendritas de neuronas. Su localización en sinapsis es dependiente de los receptores NMDA [210, 211].

GRIN1 (inductor de crecimiento neurítico regulado por proteínas G): Identificada en 1999, se expresa ampliamente en cerebro, y se encuentra enriquecida en conos de crecimiento. Se une a proteínas G heterotriméricas activadas de la subfamilia $G_i\alpha$ ($G_z\alpha$, $G_o\alpha$, $G_i\alpha$). Actúa como efector de la proteína $G_o\alpha$, la subunidad $G\alpha$ más abundante en mamíferos y específicamente expresada en cerebro. La unión de Grin1 a $G_o\alpha$ induce la formación de una red de procesos celulares similares a neuritas en células Neuro2A, a través de la activación de Cdc42 [212].

NEMITINA (proteína de interacción con MAPs enriquecida en neuronas/ proteína 47 con repeticiones WD): Proteína enriquecida en SN, donde se detecta desde E11 en adelante incluido en el adulto. Colocaliza con microtúbulos a través de su asociación con MAP8, una proteína reguladora de microtúbulos [213].

PAP (proteína asociada al extremo C-terminal de Pyk2/ proteína 2 Arf-GAP con dominios SH3 y PH, y repeticiones ANK): Esta proteína se identificó como una proteína de unión a Pyk2, la cual la activa mediante fosforilación en tirosina. Esta fosforilación no ocurre, en cambio, por FAK. PAP actúa como GAP de las proteínas GTPasas pequeñas Arf1, Arf5 y Arf6. Estas proteínas carecen de actividad intrínseca de hidrólisis de GTP de modo que necesitan obligatoriamente a proteínas GEF y GAP. Modula la localización de paxilina a contactos focales y la migración celular [214].

SRGAP2 (Slit-Robo RhoGAP2/ proteína de unión a formina). Esta proteína es una RhoGAP implicada en neuritogénesis y maduración de espinas dendríticas. Además, media la inhibición de la migración neuronal causada por slit a través de dos mecanismos: (i) provocando la inactivación de Cdc42 gracias a su actividad GTPasa y (ii) mediante su dominio F-BAR. Este dominio es necesario y suficiente para inhibir la migración radial de neuronas corticales, y actúa incrementando la formación y ramificación de filopodios mediante la deformación de la membrana celular [215, 216].

Aunque todas las proteínas aquí descritas son interesantes, nos llamó especialmente la atención la proteína drebrina, que aparece muy representada en todos nuestros ensayos de MS y como hemos visto se encuentra en espinas dendríticas regulando su morfología. Así, quisimos comprobar la interacción tanto de FAK como de Ack1 con esta proteína, para lo cual realizamos una serie de ICCs dobles en neuronas de hipocampo, como se muestra en la figura 5.3. Se aprecia una importante colocalización tanto de FAK como de Ack1 con drebrina, lo cual apoya los resultados obtenidos por MS.

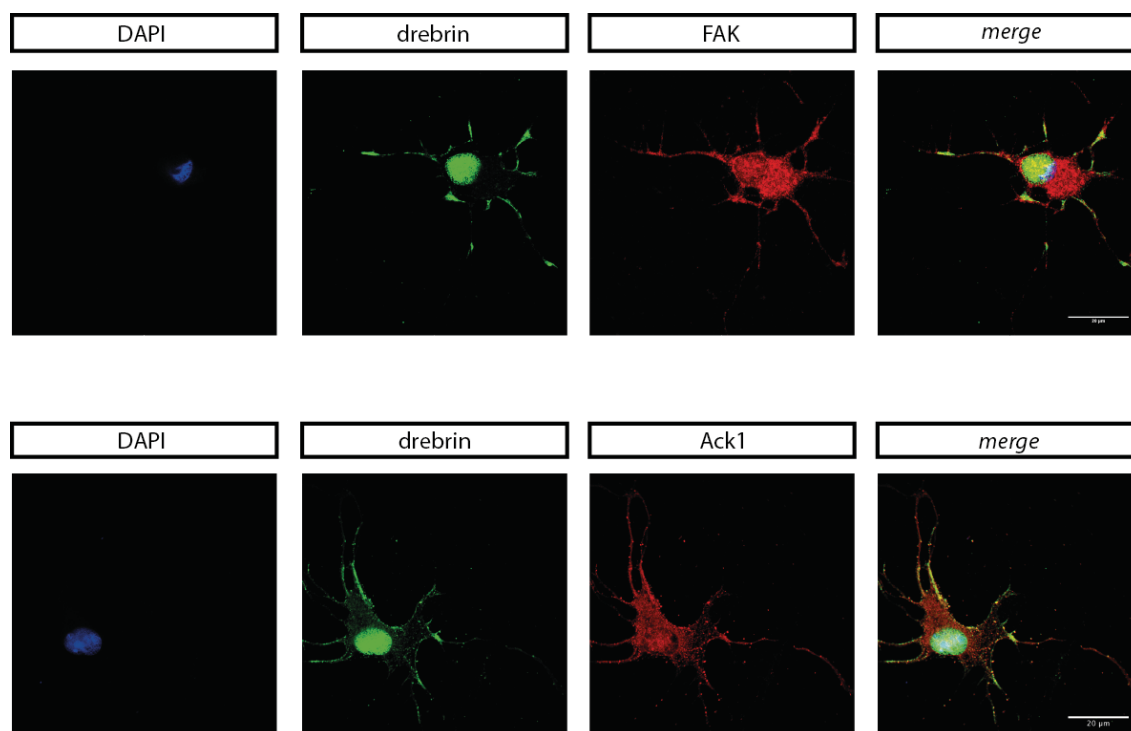


Figura 5.3. Detección por inmunofluorescencia de FAK, Ack1 y drebrina. Se usaron cultivos primarios de hipocampo de ratón E16, 7d.i.v. Los paneles *merge* muestran la superposición de los tres fluoróforos. Barras de escala: 20μm.

5.2. Análisis de la fosforilación de FAK y Ack1 por MS

La técnica de MS también es una excelente aproximación para estudiar la fosforilación de diferentes residuos proteicos [217, 218]. La técnica no obstante requiere un enriquecimiento en fosfopéptidos, especialmente para detectar fosforilaciones en tirosina que son las más complicadas. Con esta aproximación decidimos determinar las posibles diferencias en la fosforilación de FAK y Ack1 en las mismas tres condiciones anteriores (ratones P5, Control y PTZ).

La tabla 5.II resume los residuos fosforilados encontrados en las diferentes muestras analizadas, en el caso de FAK. También se describe la función de las fosforilaciones en caso de que sean conocidas, así como la referencia bibliográfica correspondiente. Los residuos que carecen de referencia han sido previamente identificados en otros experimentos de MS pero se desconoce sus función. Estas fosforilaciones se han identificado en muestras de células *in vitro*, de modo que ésta es la primera vez que se observan en SN y a partir de tejido. El residuo T914 no se había identificado en ningún caso anterior. En resumen, podemos concluir que el estado de fosforilación en el adulto (control y PTZ) es similar, mientras que se encuentran más diferencias en la comparación con animales en desarrollo.

Ratón	P5	Control	PTZ	Humano	Función	Referencias
S29	si	si	si	S29		Grigera 05
S606	no	si	si	S568		Daub 08
Y608	si	si	si	Y570		Grigera 05, Daub 08
S612	si	si	si	S574		Oppermann 09
T613	no	si	no	T575		Oppermann 09
Y614	si	si	si	Y576	<i>actividad catalítica máxima (loop de activación). Fosforilado por Sema3A y SFKs</i>	Chacón 04, Schlomann 09, Mitra 05
Y615	si	si	si	Y577	<i>actividad catalítica máxima (loop de activación). Fosforilado por Sema3A y SFKs</i>	Chacón 04, Schlomann 09, Mitra 05
S618	no	no	si	S580		Oppermann 09
S715	no	si	si	S677		Oppermann 09
S716	no	si	si	S716		Oppermann 09
S760	si	no	no	S722	<i>modula negativamente la unión de FAK a p130Cas</i>	Ma 01
S878	no	si	si	S840		Ma 01, Daub 08
S881	si	no	no	S843	<i>inhibe la fosforilación de Y397 y la migración celular. Fosforilado en respuesta a GPCR en células epiteliales del intestino</i>	Fan 05, Díaz-Hernández 08, Ma 01, Jacamo 07, Jiang 07
S948	si	si	si	S910	<i>Fosforilado por ERK2, disminuye la unión de paxilina a FAK. Fosforilado en respuesta a neurotransmisores, lípidos bioactivos, promotores tumorales y factores de crecimiento en células epiteliales del intestino</i>	Mitra 05, Ma 01, Hunger-Glasser 04, Jiang 07.
T952	no	si	si	T914		
Y963	no	si	si	Y925	<i>Fosforilado por Sema3A y Netrina, crea un sitio de unión para Grb2.</i>	Chacón 04, Liu 04, Mitra 05
T1048	no	si	no	-		
S1049	no	si	si	-		

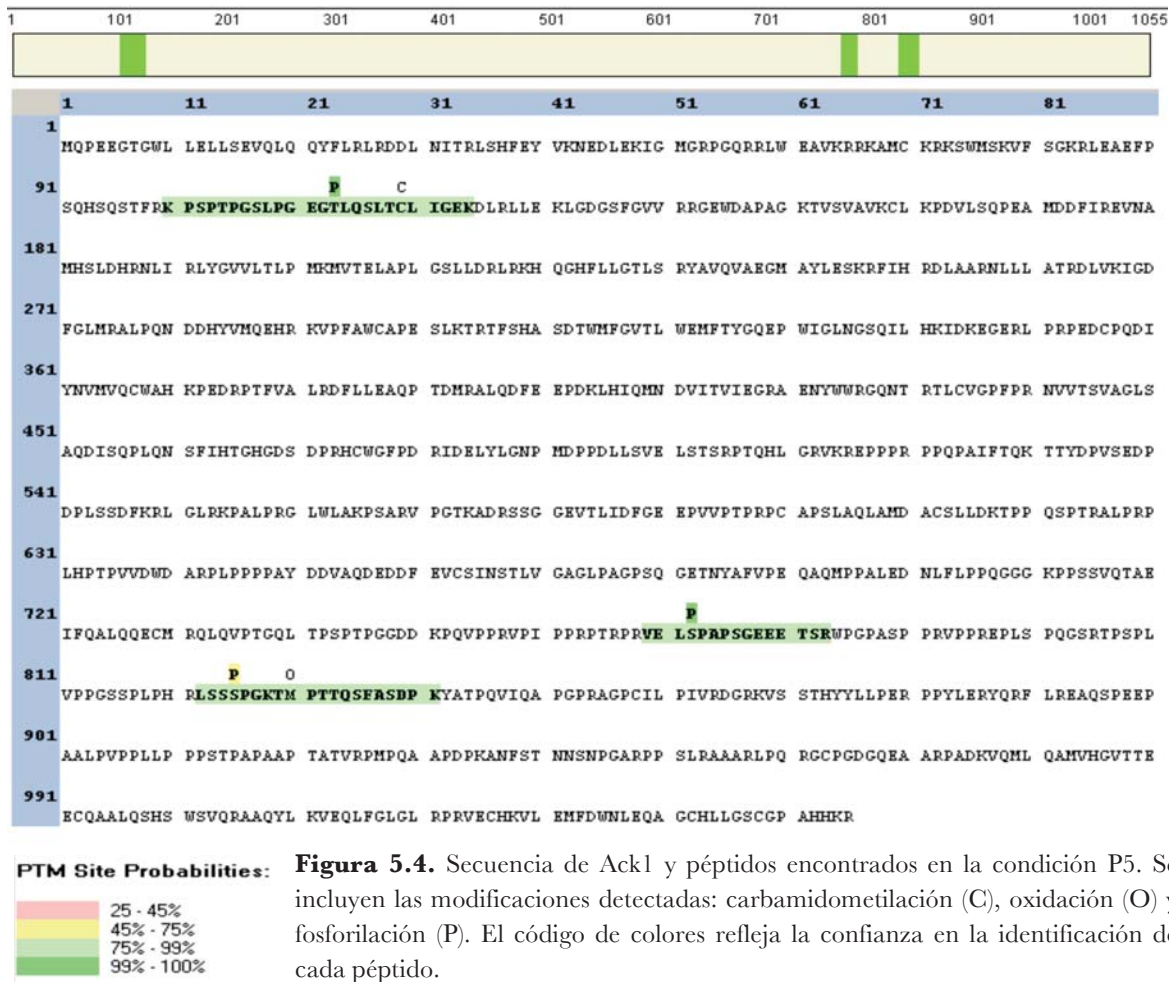
Tabla 5.II. Resumen de los residuos fosforilados de FAK encontrados mediante MS. La columna “Humano” representa la correlación en la numeración de residuos de FAK con la secuencia de ratón. El guión (-) indica que ese residuo no existe en la secuencia humana. En rojo se han destacado los residuos que están diferentemente fosforilados en alguna de las tres condiciones.

Hasta el momento, se han descrito muy pocos residuos fosforilados de Ack1 en relación con el sistema nervioso: en un macroestudio por MS de proteínas fosforiladas en cerebro de ratón se encontraron T113, T618, S622, S789 y S896 [219]; en otro estudio en células *in vitro* estimuladas con efrinas se identificó un péptido fosforilado que los autores indican que pertenece a una tirosina kinasa, sin especificar cuál. La secuencia del péptido corresponde con Ack1 y el residuo fosforilado es la S772 [220].

En nuestros datos de inmunoprecipitación con Ack1, a partir de muestras de cerebros de ratones P5 (que es la condición en la que mejor detectamos Ack1), hemos conseguido observar dos residuos fosforilados descritos previamente (T113, S772) así como un nuevo sitio de fosforilación no descrito anteriormente (S826). Las fosforilaciones que hemos detectado se resumen en la tabla 5.III y se enseñan sobre la secuencia en la figura 5.4.

Residuo	Función	Referencias
T113	? identificada en cerebro por MS	Wisniewski 10
S772	? identificada en adipocitos	Zhang 05
S826	No encontrada previamente	

Tabla 5.III. Resumen de las tres fosforilaciones encontradas por MS en muestras de cerebros P5 inmunoprecipitados con anti-Ack1.



Hemos estudiado las kinasas que podrían ser responsables de fosforilar los residuos encontrados en FAK y Ack1, utilizando el programa SCANSITE (MIT). Este programa analiza la secuencia introducida y la compara con las secuencias consenso de fosforilación determinadas para numerosas kinasas. A los resultados se les asigna un valor de *score* y percentil en función de la probabilidad real de fosforilación. Así, el *score* tiene un valor de 0 cuando la secuencia de la proteína es idéntica al motivo definido de fosforilación, y aumenta si éstas divergen. Un valor de percentil más bajo (rango: 0-1) indica una mejor especificidad. Así por ejemplo, un percentil de 0.2 (20%) indica que este sitio es mejor descripción del motivo que el 80% de los sitios potenciales en la base de datos de referencia. La base de datos usada es la categoría de vertebrados de Swiss-Prot, elegida por su baja redundancia. Específicamente, para un motivo con una serina central, todos los residuos serina de todas las proteínas de vertebrados en Swiss-Prot son calificados como sitios

potenciales. El valor de percentil nos indica el percentil dentro de los rangos de *score* en el que cae esa proteína comparado con el proteoma elegido de referencia. El programa también retorna posibles proteínas de interacción con cada secuencia.

De todos los residuos que hemos encontrado fosforilados por MS en alguna de las condiciones testadas (ver tablas 5.II y 5.III), algunos de ellos forman parte de una secuencia consenso de fosforilación por parte de diferentes proteínas. Gracias al programa ScanSite hemos podido identificar algunas de las posibles kinasas que estarían fosforilando dichos residuos. Los resultados aparecen resumidos en la tabla 5.IV. En resumen, nuestras predicciones muestran que FAK aparece como sustrato de algunas kinasas relevantes para el SNC, entre ellas GSK3, Src/Fyn, etc. En el caso de la fosforilación de Ack1, sólo hemos encontrado una posible kinasa responsable: GSK3.

Proteína	Residuo	Kinasa	score	Percentil
FAK	S677	CaMKII	0.4441	0.197
	S716	PKC- ϵ	0.4371	0.654
	S843	PKC- ϵ	0.3979	0.222
		PKC- $\alpha/\beta/\gamma$	0.4697	0.869
	S910	ERK1	0.5145	0.627
	Y925	LCK	0.5012	0.886
		Fgr-SH2	0.3782	0.083
		Src-SH2	0.413	0.636
		Fyn-SH2	0.4835	0.923
		Grb2-SH2	0.5433	0.947
	T914	GSK3	0.4897	0.235
Ack1	S772	GSK3	0.5279	0.491

Tabla 5.IV. Predicción de fosforilaciones de FAK y Ack1. Se muestran los resultados del análisis de posibles kinasas responsables de las fosforilaciones de los residuos encontrados por MS para FAK y Ack1. También se detallan proteínas de unión a algunos residuos (por ejemplo, a través de dominios SH2).

RESUMEN DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1:

Expresión de la Semaforina 4F en neuronas y oligodendrocitos del cerebro y regulación de la migración de precursores de oligodendrocitos en el nervio óptico.

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que la Sema TMB Sema4F se expresa en células neuronales y en células del linaje oligodendroglial, participando en diversas funciones propias de estas células gliales.

1. La semaforina 4F se expresa en neuronas, oligodendrocitos y OPCs durante el desarrollo del sistema nervioso.

La mayoría de los estudios clásicos realizados en semaforinas muestran que estas moléculas se expresan en neuronas y que tienen funciones relacionadas con guía axonal [76, 80, 172, 221]. Además, y debido a que su expresión persiste en el adulto, se las ha relacionado con aprendizaje y plasticidad (revisado en [222]) y con el brote axonal anormal que se produce como consecuencia de una crisis epiléptica [223, 224].

De todas las semaforinas, sin duda las transmembranales son las menos estudiadas. Como hemos visto en la introducción, las funciones de las Semas TMB en sistema nervioso son muy variadas. Así, se ha visto que miembros de las clases 4, 5, 6 y 7 controlan la sinaptogénesis y tienen funciones en migración celular [67, 75, 222, 225].

Hasta hace relativamente poco no se había descrito la presencia de semaforinas en células de la glía [96, 226]. De las Semas TMB en oligodendrocitos hay igualmente muy poca información. Se ha visto que la Sema4D se sobreexpresa en oligodendrocitos después de una lesión de espina dorsal, participando por tanto en la inhibición del crecimiento axonal después de lesiones traumáticas [91]. La Sema 6A inhibe la diferenciación de oligodendrocitos [227]. En cuanto a la Sema4F, lo único descrito hasta ahora en la literatura es su papel como inhibidor de la proliferación de células de Schwann [96] y su expresión en neuronas asociada a la PSD95, con quien interacciona vía sus dominios PDZ [95]. Actúa provocando el colapso del cono de crecimiento axonal [94]. Además, se expresa más abundantemente en el cerebro adulto que durante el desarrollo [94]. Nuestros resultados indican que Sema4F se expresa en el cerebro no sólo en neuronas sino también en oligodendrocitos en desarrollo y maduros.

Los estudios de ISH muestran que la Sema4F es expresada por precursores neuronales (Figs. 1.1A, B, D, E, CP, O, EGL) y neuronas maduras (poblaciones del hipocampo en Figs. 1.1C, F; células mitrales en K; IGL en P). Estos datos son coherentes con y amplían estudios previos sobre la distribución de Sema4F [94]. Además, aquí describimos que Sema4F se expresa también en vías ricas en OPCs como la sustancia blanca (Figs. 1.1B y E, flechas) y en oligodendrocitos maduros (Fig. 1.6H, flechas). De acuerdo con los datos de ISH, la IR de Sema4F *in vivo* se encontró no sólo en poblaciones neuronales sino también a lo largo de las vías de migración de neuronas (aSVZ en Figs. 1.3H e I; RMS en M) y de oligodendrocitos (Figs. 1.3B, *, E, *, O y 5A). Además, los cultivos demuestran que Sema4F se expresa en OPCs (Figs. 1.8C-E, F-H e I-K), lo que confirma nuestros datos *in vivo*. Finalmente, los experimentos de colocalización con marcadores de OPCs indican que la mayoría de OPCs Olig2-positivos en el nervio óptico (Figs. 1.8I-K) y en otras áreas del cerebro (Figs. 1.7A-F) expresan Sema4F.

Es interesante destacar la presencia de una banda de casi 80KDa en los ensayos de WB de lisados de cerebro adulto (Fig. 1.2F, asteriscos). Esta banda es coherente con una forma más pequeña detectada en cultivos transfectados (Fig. 1.2C) y podría corresponder a una forma truncada de la semaforina. Esta forma difusible podría dar lugar a un efecto de repulsión más amplio, como se ha descrito para Sema4D en los sistemas vascular e inmune [228, 229]. Recientemente se ha visto que otra Sema TMB, la Sema5B, ejerce un efecto de colapso del cono de crecimiento más fuerte al ser proteolizada en un fragmento soluble [87].

Otras moléculas transmembranales en SN también sufren procesos proteolíticos. Por ejemplo, el receptor transmembranal notch se proteoliza cuando se une a su ligando delta, y el fragmento se transloca al núcleo donde se une a diversos factores de transcripción para especificar el linaje celular durante el desarrollo [3]. Es interesante también el caso de la proteína de adhesión neural NCAM: su estimulación genera un fragmento proteolizado, que incluye los dominios transmembranal y carboxilo-terminal, que se transloca al núcleo unido a calmodulina. Paralelamente, la activación de NCAM provoca la generación de otro fragmento proteolítico, esta vez del dominio amino-terminal de FAK, que también se transloca al núcleo. Las funciones de estos fragmentos en el interior del núcleo neuronal se desconocen, pero allí podrían interactuar con factores de transcripción para modular algunas de las funciones de NCAM en el SN, como por ejemplo la plasticidad sináptica [153].

2. Sema4F inhibe la migración de oligodendrocitos y estimula su diferenciación.

Los oligodendrocitos se han considerado tradicionalmente como simples soportes de neuronas. Esta visión simplificada está empezando a cambiar, debido a una serie de descubrimientos que implican que las neuronas ya no se pueden considerar los únicos tipos celulares que disparan impulsos eléctricos en el cerebro, y que las sinapsis entre neuronas no son la única manera mediante la que la información eléctrica es regulada en su propagación por los circuitos neuronales. Se ha descubierto una nueva categoría de OPCs en la sustancia blanca del SNC de rata, llamados disparadores (*spiking*), que muestran una corriente espontánea mediada por canales de sodio dependientes de voltaje, y responden a actividad neuronal generando potenciales de acción [10]. Estos OPCs podrían representar una ventaja en trasplantes para promover la remielinización después de daños o en esclerosis múltiple: los OPCs excitables podrían notar los axones que disparan impulsos y mielinizarlos preferentemente, modulando la plasticidad de la materia blanca en respuesta a actividad y experiencia [20]. Otro estudio muestra que la propagación de potenciales de acción puede regularse por oligodendrocitos: se ha visto una despolarización de oligodendrocitos maduros de hipocampo en respuesta a estimulación axonal tipo *theta*, y los oligodendrocitos despolarizados provocan una reducción de la latencia de la conducción del impulso a través de los axones [230]. Finalmente, un grado incluso mayor de complejidad en la relación entre neuronas y oligodendrocitos se ha puesto de manifiesto mediante el descubrimiento de que OPCs del hipocampo reciben impulsos directos de interneuronas GABAérgicas, que pueden modular su desarrollo [3, 18]. La identificación de moléculas que controlan la fisiología de los oligodendrocitos puede tener, por tanto, funciones importantes en diversos ámbitos fisiológicos del SN.

Un proceso crucial en la fisiología de los oligodendrocitos, y muy estudiado en el contexto de la remielinización tras lesiones, es la migración. La migración de OPCs está controlada por diversos factores, incluyendo PDGF, Net-1 y Shh [21, 47, 169, 231].

De acuerdo a nuestras observaciones, Sema4F se expresa en oligodendrocitos y en sus precursores. También hemos determinado que esta semaforina inhibe la migración de OPCs sin interferir en su proliferación. Este resultado es específico puesto que la adición de anti-4F revierte la inhibición de la migración en cultivos expuestos a Sema4F. Además, la incubación de explantes con anti-4F incrementa el número de OPCs migratorios, sugiriendo que la Sema4F endógena participa en la migración de OPCs. Esto también se observa en experimentos realizados en cámaras quimiotácticas (Figs. 1.9D y F). Otras semaforinas, como la Sema3F, atrayente, y la Sema3A, repulsiva, modulan la migración de OPCs a lo largo del nervio óptico ([21, 168]; ver Introducción). Sema4F, a pesar de encontrarse anclada a membrana, podría tener una función similar a la de la Sema3A difusible, es decir, contribuyendo a la correcta migración de OPCs en el nervio óptico y asegurando que las células no se dispersan sino que progresan por el nervio.

Los receptores de las semaforinas son habitualmente plexinas, que son proteínas transmembranales que contienen un dominio Sema, por el cual interaccionan con las semaforinas [70]. En el caso de las semaforinas transmembranales hay que tener en cuenta, además, que pueden darse procesos de señalización reversa hacia la célula que contiene la sema, inducidos bien por unión homofílica o heterofílica con plexinas [64]. La señalización también puede iniciarse por interacciones en *cis* o en *trans* con otras moléculas de semaforinas transmembranales, como en el caso de la Sema6A [86]. También se han identificado las integrinas como receptores de algunas Semas TMB, como por ejemplo de la Sema7A [172]. En el caso de Sema4F se desconoce su receptor, aunque se sabe que otras semaforinas de la familia 4 señalizan a través de plexinas de clase B. Por el momento, por tanto, no podemos determinar si las dos funciones de Sema4F que hemos detectado en oligodendrocitos (inhibición de la migración y promoción de su diferenciación) están mediadas por mecanismos diferentes o solapantes.

Aunque el mecanismo de acción preciso de la Sema4F en migración y diferenciación de OPCs falta por descubrir, Sema4F deberá añadirse a la lista de mecanismos de contacto con relevancia fisiológica en migración de OPCs: Sema4F limita la movilidad de OPCs, al igual que anosmina-1, tenascina-1, PSA-NCAM, N-cadherinas, efrinas, y al contrario que los efectos observados para laminina o fibronectina (revisado en [21, 47]).

En nuestro estudio, Sema4F contribuye a la diferenciación de OPCs cerebrales, de modo que esta semaforina podría no sólo organizar la migración de precursores sino también incrementar su diferenciación a oligodendrocitos maduros mielinizantes en etapas inmediatamente posteriores. Tras una lesión desmielinizante en el SN se ponen en marcha mecanismos para asegurar la remielinización de las fibras por parte de los oligodendrocitos. En la zona de la herida se expresan varias semaforinas secretables y al menos una transmembranal (Sema4D), cuya expresión aumenta después de la lesión [91, 232]. Los oligodendrocitos, en esta situación, proliferan y migran hacia el sitio de lesión, donde se detienen y se diferencian [233]. Según nuestros datos de la funcionalidad de Sema4F en OPCs (inhibición de la migración y estimulación de la proliferación), es posible que esta proteína esté implicada en la segunda parte del proceso de remielinización: la Sema4F expresada en el lugar de la lesión podría actuar como señal de parada para los OPCs migratorios. Una vez allí, induciría su diferenciación a oligodendrocitos maduros para asegurar la remielinización axonal. Así, los datos obtenidos en este capítulo sugieren un más que posible papel fundamental de Sema4F en procesos de remielinización, pudiendo ser relevante para la patogénesis y/o terapia de enfermedades desmielinizantes, como la esclerosis múltiple y otras enfermedades que muestran desmielinización secundaria relevante (daño traumático, enfermedad de Alzheimer,

etc). Para poder comprobar esta hipótesis sería necesario realizar varios experimentos que incluyan el análisis de la expresión de Sema4F en la zona de la lesión.

Capítulo 2:

Vía de señalización de Sema4F en OPCs: papel de FAK.

En este apartado se describe FAK como un posible mediador de las funciones de Sema4F en OPCs descritas en el capítulo anterior.

1. Sema4F activa FAK en OPCs.

FAK es un componente crucial de la maquinaria de señalización celular encargada de transducir la información del exterior al interior celular. Su posición central conectando las señales que le llegan a la célula con el citoesqueleto de actina lo coloca por debajo de múltiples moléculas señalizadoras, incluidas las semaforinas. Su papel está muy bien definido como transductor de la señal iniciada por semaforinas difusibles como Sema3A [73, 79, 140], pero en cambio apenas hay resultados en cuanto a la señalización por semaforinas transmembranales. La Sema4D, a través de la unión a su receptor PlexB1, induce migración neuronal y colapso del cono de crecimiento mediante la modulación de proteínas pequeñas RhoGTPasas. Además, tiene efectos opuestos sobre la función de integrinas, por debajo de las cuáles se encuentra FAK [64]. La Sema7A, señalizando a través de integrinas, induce extensión de neuritas y migración celular. Para ello requiere el *clustering* de integrinas, lo cual activa FAK y la vía de MAPK. Es interesante resaltar que Sema7A tiene efectos positivos o negativos sobre la migración en función del receptor al que se una (integrinas o PlexC1, respectivamente) [64, 172]. En oligodendrocitos se están empezando a identificar las funciones de las semaforinas, y se desconoce si éstas actúan a través de FAK, pero es de esperar que lo hagan, igual que sucede en neuronas.

Todos estos datos inducen a pensar que, a pesar de que se desconoce el receptor y el mecanismo de actuación de Sema4F, sus efectos anti-migratorios (que necesariamente deben cursar con cambios en el citoesqueleto), están transducidos por FAK. FAK se expresa en oligodendrocitos, donde tiene funciones principalmente relacionadas con procesos de mielinización. Nuestros datos indican que existen diversos residuos fosforilados en FAK en OPCs (Fig. 2.1). Los niveles de fosforilación son no obstante más bajos que en el caso de astrocitos o neuronas, lo cual podría indicar una fina regulación de la actividad de esta proteína en OPCs. De hecho, se observa un patrón de fosforilaciones específico en oligodendrocitos respecto a neuronas y astrocitos, representado esquemáticamente en la siguiente tabla:

	Y397	Y861	Y925
Astrocitos	++	++	+++
OPCs	-	+	++
Neuronas	+++	++	+++

El hecho de que la fosforilación basal de Y397, el sitio de autofosforilación de FAK necesario para su activación, sea tan baja en OPCs (aunque no indetectable) apunta a una fina regulación de este residuo en este tipo celular. De hecho, al añadir medio condicionado Sema4F observamos un

incremento en la fosforilación de Y397 (Fig. 2.2, 2.3). Estos resultados confirman que Sema4F es capaz de inducir la activación de FAK mediante su fosforilación en Y397.

Nuestros resultados indican también que la fosforilación que se aprecia más intensa en OPCs en estados basales es la correspondiente al residuo Y925, que supone un sitio de unión de proteínas con dominios SH2 como Grb2. Grb2 señala activando la vía Ras/ERK2/MAPK, y se ha visto que varias Semas TMB ejercen su acción a través de esta vía [45, 171, 172, 234]. En nuestro caso en cambio no observamos un incremento en la fosforilación de ERK1/2 al tratar con Sema4F, como tampoco vimos cambios en el estado de fosforilación de GSK3, otra proteína previamente relacionada con Semas TMB [173].

El residuo Y861 también aparece fosforilado en OPCs, prácticamente al mismo nivel que en astrocitos y neuronas. Su fosforilación permite la unión de p130Cas, que como hemos visto en la introducción es un importante promotor de la migración celular vía activación de Rac y Cdc42 [104]. En neuronas, es fosforilado por moléculas de atracción, como Net-1 [131, 132], y desfosforilado por moléculas que provocan repulsión, como Slit2 y Sema3A [79, 129]. Será interesante también comprobar el papel de esta tirosina en oligodendrocitos.

2. FAK está implicado en la migración pero no en la diferenciación de OPCs mediada por Sema4F.

Como hemos visto en el capítulo 1, la adición de medio Sema4F a explantes de nervio óptico provoca una disminución del número de OPCs que migran (Figs. 2.4.A, B, E y Fig. 1.9). Nuestros resultados también muestran un importante efecto de FAK en la migración de OPCs: la inhibición de FAK disminuye significativamente el número de OPCs migratorios (Figs. 2.4.C y E). Cuando tratamos los OPCs conjuntamente con inhibidor de FAK y medio 4F observamos una reversión del efecto antimigratorio de Sema4F.

La adición del inhibidor de FAK ejerce una importante disminución del número de OPCs que salen del explante en el control, confirmando el papel positivo de FAK en migración. El papel de FAK en migración ha sido muy estudiado: en general, la activación de FAK mediante su fosforilación en Y397 promueve protrusiones en la membrana, incrementa la tasa de recambio de adhesiones focales y promueve la migración celular. Hay varios mecanismos por los que se ha visto que FAK promueve la migración. Por ejemplo, la formación del complejo activo FAK-Src induce la fosforilación y reclutamiento de p130Cas, la cual se une a una proteína adaptadora de la familia CRK y esto activa la RhoGTPasa Rac1 y/o Cdc42. El reclutamiento de p130Cas requiere la fosforilación del residuo Y861 de FAK [99]. Además, durante la especificación de la estructura cortical, se ha visto que FAK fosforilado en S732 por Cdk5, un regulador clave de la migración neuronal, controla la organización del citoesqueleto de microtúbulos de neuronas en migración. [40, 123, 235].

Específicamente en oligodendrocitos, se ha visto que el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) induce la migración de OPCs mediante la activación de Cdk5, que es fosforilada por la kinasa Fyn [159]. Cdk5 fosforila la proteína WAVE2, de la familia WASP, que actúa vía Rac para inducir lamelipodios y repliegues membranales. Aunque en el citado artículo no se menciona FAK, podría estar implicada en este proceso dado su relación con Cdk5 y proteínas de las familias WASP y RhoGTPasas. Sí se ha identificado un papel crucial de FAK en el incremento de la migración de OPCs inducida por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). En este caso la

señalización conlleva un incremento en la unión de FAK a paxilina que provoca la reorganización del citoesqueleto de actina de los OPCs [158]. Interesantemente, estos efectos se observan exclusivamente en migración de OPCs, sin alterar su proliferación ni su diferenciación.

En nuestro caso se obtienen unos resultados inesperados puesto que vemos que Sema4F induce la activación de FAK, y a la vez esta semaforina inhibe la migración de OPCs. Nuestros resultados sugieren que la activación de FAK por Sema4F podría tener diferentes efectos en función de la escala temporal: Por un lado hemos visto que Sema4F, a tiempos cortos (minutos), induce la fosforilación de FAK (Fig 2.2). Por otro lado a tiempos largos (días) FAK promueve la migración de OPCs (Fig 2.4). Además, Sema4F por sí misma inhibe la migración de OPCs. La activación de FAK se correlaciona bien con la función inhibitoria de la semaforina. Desgraciadamente, nuestros datos no excluyen que pueda operar por otra vía. Así, nuestros datos sugieren varias hipótesis: (i) FAK no interviene en la migración inhibida por Sema4F, (ii) FAK funciona en migración de manera independiente a la fosforilación mostrada en la figura 2.2, (iii) a tiempos cortos, Sema4F activa FAK, mientras que a largo plazo, la activación de FAK propicia cambios en la expresión génica compatibles con migración (o diferenciación). Se hace necesario usar en futuros ensayos una forma de FAK constitutivamente activa, por ejemplo, para comprobar si anula la acción de 4F, y también para determinar otras posibles proteínas implicadas en la vía de Sema4F.

Aunque faltarían experimentos para comprobar las hipótesis, nuestros datos también podrían apoyar la existencia de un nuevo mecanismo poco caracterizado hasta la fecha por el cual la activación de FAK da lugar a una inhibición de la migración. Anteriormente ya se han visto casos en los que la activación de FAK puede dar lugar a efectos opuestos. Este papel dual de FAK se ha observado en varios procesos celulares:

- (i) FAK es capaz de asociarse a proteínas activadoras (p190RhoGEF) e inhibitoras (p190RhoGAP) de Rho [105]; la activación de RhoA se asocia con una inhibición de la migración celular.
- (ii) FAK activo puede promover una mayor fluidez del citoesqueleto de actina mediante la fosforilación de p190RhoGEF, que activa de RhoA/MLCK, pero si fosforila α -actinina en vez de p190RhoGEF se incrementa la tensión del citoesqueleto [98].
- (iii) Tanto las interacciones célula-ECM (mediadas por integrinas) como las interacciones célula-célula (mediadas por cadherinas) son importantes en la migración celular. En este contexto, FAK regula el desensamblaje de uniones celulares basadas en cadherinas pero también se le ha implicado en promover una unión célula-célula eficiente [105]. Además, se ha visto que una menor actividad de FAK provoca un incremento en la migración de células de carcinoma debido a la disolución de contactos N-cadherina entre células [98, 236, 237].
- (iv) La inhibición de FAK (fosforilación en S910 y desfosforilación de Y397) inducida por Ras promueve la migración de células cancerígenas [110].
- (v) CaMKII actúa incrementando la tasa de recambio de adhesiones focales y promoviendo la movilidad celular a través de la inducción de la desfosforilación de FAK en Y925, si bien no modifica la de Y397 [238].
- (vi) En *Drosophila*, la Sema TMB Sema1a actúa como inhibidor de la guía axonal mediante desfosforilación de FAK [239].

No debemos olvidar que no es inusual que el otro miembro de la familia, Pyk2, compense alguna de las funciones de FAK, como se ha visto sobre todo en procesos de migración y adhesión celular

[105]. De este modo, una inhibición de FAK podría estar revertida en la célula, a nivel funcional, por Pyk2.

Por último, es importante recordar que un gran número de las funciones de FAK se llevan a cabo no mediante su actividad kinasa sino mediante su habilidad de reclutar diferentes proteínas intracelulares, actuando como *scaffold* o andamio. Así, conviene destacar que la autofosforilación de FAK en el residuo Y397 abre las puertas a la fosforilación de múltiples residuos en FAK que generan distintos sitios de unión de diversas proteínas. Además, se ha descrito la fosforilación de otros residuos (S843 y S910) de manera independiente a la fosforilación de Y397 en respuesta a diferentes estímulos, como neurotransmisores, lípidos, factores de crecimiento, etc. [240]. Estos resultados apuntan a que no siempre la fosforilación en Y397 es necesaria para la actividad de FAK.

Probablemente haya nuevas proteínas asociadas a la vía de señalización de Sema4F/FAK que se desconocen por el momento. Este mecanismo podría ser específico de células del linaje oligodendroglial y/o específico de Sema4F. En resumen, los datos aquí presentados apuntan a una nueva vía de actuación en cuanto a la regulación de la migración celular, aunque faltan nuevos experimentos que ayuden a confirmar estos resultados.

Por otro lado, FAK no parece estar implicado en el incremento de la diferenciación de OPCs inducido por Sema4F. Este resultado también es inesperado puesto que hay varios estudios en la bibliografía que implican a FAK en mielinización:

- (i) En ratones a los que se les ha eliminado la expresión de FAK en células de Schwann se aprecia una mielinización axonal deficiente debido a defectos en la proliferación celular [241].
- (ii) En oligodendrocitos, la activación de FAK vía Fyn o laminina-integrina provoca un incremento en el crecimiento de procesos celulares de células de linaje oligodendroglial CG4 [163].
- (iii) En el model murino inducible de depleción de FAK en células plp⁺ del linaje oligodendroglial (Fak^{flox/flox}; PLP/CreER^T) se observó una mielinización deficiente del nervio óptico [164], debido a un menor número de procesos celulares.
- (iv) El sustrato de ECM tiene efectos diferentes en la mielinización mediados por FAK: en fibronectina, FAK inhibe la expansión de la red de procesos celulares, mientras que en laminina promueve la maduración celular [162].

Los resultados de Lafrenaye y cols., 2010 [162] apuntan a un efecto de FAK en la diferenciación. Nosotros no hemos detectado ningún efecto en este proceso tras la inhibición de FAK, ni por sí sólo ni por debajo de Sema4F (datos no mostrados). Las diferencias podrían explicarse porque en nuestro caso, los experimentos de diferenciación se llevaron a cabo adhiriendo la proteína Sema4F extracelular sobre lisina. En el estudio de Lafrenaye y cols., 2010 [162] confirman los resultados obtenidos mediante transfección de shRNAi-FAK utilizando el inhibidor de FAK PF-228 a una concentración de 100nM, como en nuestro caso. En cambio, en ese artículo se cultivaron las células con el inhibidor durante 4h y después se mantuvieron sólo durante 15-20h mientras que en nuestro caso se mantuvieron durante 3 días. Así, es posible que la ausencia de función que nosotros vemos se deba a una dilución del efecto por el tiempo de cultivo.

Por supuesto, no hay que descartar la explicación inicial según la cual Sema4F no actúa vía FAK para inducir diferenciación. Por ejemplo, se ha visto que cuando se bloquea la expresión de NG2,

un proteoglicano expresado por OPCs , se produce una drástica reducción de la migración de OCPs embrionarios y postnatales, sin verse afectado el proceso de diferenciación [27]. En los experimentos de diferenciación usando el inhibidor de FAK no se ve tan claramente, en condiciones basales, el aumento en la tasa de diferenciación como lo veíamos en los datos iniciales. Esta diferencia quizá se deba a que el tratamiento con el inhibidor requiere unas condiciones específicas.

Capítulo 3: Isoformas de FAK.

En este apartado se presentan resultados sobre la diferente expresión en células neurales de isoformas de FAK, generadas mediante procesos de *splicing* alternativo.

La isoforma “estándar” o ubícuca (FAK⁰) carece de exones adicionales, pero las moléculas de FAK que se expresan en el cerebro incluyen como mínimo la inserción de 3 aa PWR (FAK⁺) [119]. Nuestros datos de WB (Fig. 3.1.) y los de SB (Fig. 3.2) apuntan a que la forma de FAK más común en las dos zonas del cerebro estudiadas es la que presenta las cajas de 3, 6 y 7 aa, de acuerdo con la bibliografía [116, 117].

El *splicing* alternativo que sufre FAK fue descrito por primera vez en 1996 [118]. Se ha visto desde entonces que las isoformas de FAK se expresan preferentemente en el cerebro, y por tanto se ha postulado que estas inserciones podrían conferir alguna función específica a FAK en el SNC. Hasta el momento se desconoce cuál, pero se han indicado varios aspectos específicos de estas isoformas. Así por ejemplo, se ha visto que la inclusión de las cajas de 6 y 7 aminoácidos, que rodean el sitio de autofosforilación de FAK, repercute en un incremento en su autofosforilación obteniendo por tanto un FAK más activo [116]. Dado que la expresión de FAK se encuentra enriquecida en los conos de crecimiento neuronales, este mayor grado de autofosforilación podría suponer, por ejemplo, una mayor movilidad del cono de crecimiento que le permitiría a la neurona responder más fácilmente a las distintas señales de guía axonal. La expresión de esta isoforma en hipocampo (Fig. 3.2) podría modular la respuesta de FAK a neurotransmisores o lípidos de señalización.

La inclusión de tres aminoácidos en la zona carboxi-terminal de la proteína (FAK⁺) no afecta a la localización de la proteína en las adhesiones focales, a pesar de que codifica para residuos cargados y voluminosos (prolina, triptófano y arginina) y de que se expresa en el dominio de localización a adhesiones focales FAT [242]. La isoforma FAK⁺ está específicamente regulada por neurotransmisores y mensajeros extracelulares lipídicos [243-245]; esta regulación podría deberse no a una localización diferente de la proteína respecto a otras isoformas sino quizá a una diferente interacción con otras proteínas. De hecho, se ha visto que FAK⁺ y FAK^{+,6,7} interaccionan de manera distinta con las proteínas Src, Fyn y PI3K [120]. Por último, la isoforma FAK^{+,6,7} es activada específicamente por estimulación con cannabinoides en el hipocampo [246].

Existen muchas proteínas en el cerebro que presentan *splicing* alternativo. La existencia de un mecanismo de *splicing* alternativo permite una mayor eficiencia, puesto que la información se guarda de una manera más económica, además de proporcionar mayor flexibilidad a nivel evolutivo. Algunos ejemplos son:

- La molécula de adhesión neural NCAM, implicada en adhesión y migración celular durante el desarrollo y en procesos de plasticidad sináptica en el adulto, presenta tres isoformas generadas por *splicing* alternativo: NCAM-180, NCAM-140 y NCAM-120 [197]. Se ha visto que FAK interacciona con NCAM-140 [247].
- Pyk2, el otro miembro de la familia de FAK, tiene dos isoformas definidas por la inserción o no de un exón que codifica para 42 aa. La isoforma que contiene el exón es la que se expresa predominantemente en cerebro [248].
- Src presenta dos isoformas generadas por *splicing* alternativo. Una de ellas es exclusiva de neuronas y responde rápidamente a inducción neural, pero se desconoce su función específica [249].
- Las neurexinas, una familia de proteínas de adhesión que se expresan en el compartimento presináptico, están codificadas por tres genes que sufren *splicing* alternativo para dar lugar a más de mil isoformas. Este proceso está regulado de manera diferente según la región cerebral, y además se modula por actividad neuronal, proporcionando un mecanismo de regulación de la especificidad sináptica [154].
- La isoforma Rac3, pero no la Rac1, de la familia de proteínas RhoGTPasas promueve la neuritogénesis y ramificación axonal *in vitro*. Esta función se localiza en la parte carboxilo-terminal de la proteína, que es la única región en la que difieren Rac1 y Rac3 [43].
- Dab1 es una proteína adaptadora que se encuentra en la vía de señalización de reelina, y es esencial para el posicionamiento de neuronas y la generación de la organización laminar del cerebro de mamíferos. La inclusión de dos exones en Dab1 modifica su función, provocando una migración neuronal anormal [250]. Dab1 puede ser fosforilada por Cdk5 de manera diferente según la isoforma presente (en serina de p45Dab1 o en tirosina de p80Dab1), lo cual se traduce en una diferente afinidad de la kinasa Fyn por Dab1 [251].
- Por último, la des-regulación del proceso de *splicing* alternativo puede estar implicada en diversas enfermedades neurales. Así por ejemplo, más de la mitad de los pacientes de ataxia-telangiectasia y neurofibromatosis de tipo 1 presentan mutaciones que afectan al *splicing* [252].

Hasta la fecha no existía ningún dato sobre la expresión de las isoformas de FAK en oligodendrocitos. Una razón para la existencia de estas isoformas en cerebro podría ser que determinen la localización diferencial de la proteína en distintas células nerviosas. En nuestros resultados, sin embargo, no hemos visto diferencias notables en la expresión de las isoformas de FAK en neuronas, astrocitos u OPCs. En cuanto a astrocitos, previamente sólo se había detectado FAK⁺ pero no FAK^{+,6}, FAK^{+,7} ni FAK^{+,6,7} [117, 118, 242]. En cambio, nuestros resultados muestran que sí hay expresión de las cajas 6, 7 y 28 en astrocitos. Los datos previos se obtuvieron mediante inmunoblot o ICC, mientras que nuestros resultados se han obtenido a partir de muestras *in vivo* y mediante una técnica mucho más sensible, que incluye la amplificación por PCR de la zona de interés junto con una hibridación con sondas específicas marcadas radiactivamente. La mayor sensibilidad de la técnica podría explicar la aparente discrepancia. Las diferencias también podrían deberse a que los transcritos sólo se tradujeran en condiciones particulares.

En conclusión, la isoforma de FAK más abundante en neuronas y células gliales es la que incluye las cajas 3, 6, y 7. Como se ha visto anteriormente [117], la presencia de las cajas 6 y 7 otorga a la proteína un mayor grado de autofosforilación, que no se incrementa por la presencia de la caja 28. Esto podría explicar porqué ésta es la isoforma más común, y en cambio FAK^{all}, que no aportaría ninguna ventaja adicional en este sentido, apenas está representada.

Capítulo 4:

Interacción de FAK y Ack1.

Los resultados de este capítulo establecen y definen, por primera vez, la interacción entre FAK y Ack1, caracterizando el tipo de relación que existe entre estas dos proteínas, y determinan la respuesta de Ack1 al crecimiento neurítico inducido por Net-1. Todos los experimentos de este capítulo y del capítulo 5 se llevaron a cabo en colaboración con María del Mar Masdeu (laboratorio Dr. Soriano).

1. FAK y Ack1 interaccionan *in vitro* e *in vivo*.

En los estudios de interacción por coimmunoprecipitación, resumidos en la figura 4.1., observamos una clara interacción entre FAK y Ack1. La interacción no tiene lugar a través de los dominios ricos en prolina de Ack1 ni requiere la actividad kinasa de dicha proteína. Ack1 presenta otros dominios a través de los que podría interaccionar con FAK, además del dominio kinasa y las regiones ricas en prolina, que suponen el 50% de la proteína. Ack1 presenta un dominio amino-terminal SAM, un dominio Cdc42/Rac (CRIB), una región de unión a clatrina, otra de unión a ubiquitina y una región con homología a Mig6 (MHR) [149]. Ack1 es la única kinasa no receptora en la que el dominio SH3 está localizado C-terminal respecto al dominio kinasa, y la única también que contiene el dominio CRIB. Presenta una interacción autoinhibitoria entre el dominio MHR y la zona C-terminal. Su activación, hasta el momento, se ha visto que depende de tres tipos de señales estimuladoras: unión de Cdc42 activada al dominio CRIB, unión de secuencias poli-prolina al dominio SH3 y fosforilación del dominio MHR por receptores activados como EGFR [149].

Como hemos visto anteriormente, existen diversas isoformas de FAK expresadas en el SN. De momento se desconoce su función, aunque es posible que tengan diferentes afinidades de unión a otras proteínas. Dado que FAK funciona principalmente como proteína de anclaje, es interesante estudiar si la presencia de las diversas cajas en el dominio kinasa o en el dominio FAT de la proteína afectan a la interacción con Ack1. Los resultados obtenidos, sin embargo, no indican *a priori* una preferencia de Ack1 por ninguna de las isoformas estudiadas. Las aparentes diferencias observadas en las bandas en la figura 4.1C parecen deberse a diferencias en las cargas, ya que la técnica de inmunoprecipitación no es cuantitativa.

2. FAK y Ack1 son requeridas para su activación.

El papel de FAK en la ramificación neurítica presenta cierta controversia, y parece que FAK tiene un papel dual en función del tipo celular, las proteínas asociadas o los mecanismo de activación, habiéndose observado por tanto efectos positivos o negativos de FAK sobre la ramificación [141]: Por un lado, la ausencia de FAK en células de Purkinje o de hipocampo de ratón es la causa del incremento en la arborización axonal observado en estas neuronas. El aumento del número de ramas axonales se debe a un incremento en la formación de ramas a la vez de una disminución en la tasa de eliminación. Estos efectos son mediados por el activador de la vía de señalización de Rho p190RhoGEF [126]. En este caso, por tanto, FAK actúa como regulador negativo de la neuritogénesis [141].

Por otro lado, se ha visto que FAK participa en el crecimiento de dendritas de neuronas de hipocampo inducido por Sema3A (ver Introducción y [140]). Asimismo, el silenciamiento de FAK

se traduce en una disminución en el número y la longitud de neuritas de hipocampo. Además, la inhibición farmacológica de FAK previene el crecimiento neurítico inducido por NGF [141]. FAK también actúa como regulador positivo del crecimiento neurítico señalizando por debajo de integrinas, factores de crecimiento [253] y del receptor de ATP P2X7 [141, 254].

FAK también tiene un papel dual en otros contextos de plasticidad. Así, FAK se activa por los receptores EphB para mantener el fenotipo maduro de las espinas dendríticas, a través de la activación de cofilina [156], pero a la vez se ha visto que la activación de FAK es necesaria para el acortamiento de las espinas, también a través de EphB [255].

En el caso de Ack1, apenas se conoce su función en el SN. Datos no publicados del laboratorio (La Torre y Masdeu, 2012) indican que Ack1 es un elemento crucial de la señalización por neurotrofinas que da lugar al incremento en la ramificación neurítica: la fosforilación y activación de Ack1 es necesaria para el aumento en la ramificación provocado por neurotrofinas. Ack1 interacciona con Cdc42 activada [256], y uno de los sustratos de Ack1, cuando está activa, es WASP, que al ser fosforilada en serina incrementa la polimerización de actina [149]. De esta manera, Ack1 regula la dinámica del citoesqueleto de actina.

Nuestra hipótesis se basa en que ambas proteínas ejercen un papel crucial sobre la ramificación. Así, supusimos que entre ellas existe o bien una relación de activación opuesta, directa o indirecta (la activación de una daría lugar a la inhibición de la otra y viceversa) o bien actúan en la misma dirección para promover el crecimiento neurítico. Nuestros resultados indican que esta relación es algo más compleja. Hemos visto, por un lado, que la inhibición de FAK previene el incremento en la fosforilación de Ack1 inducida por la neurotrofina BDNF. Por otro lado, la ausencia de Ack1 evita el incremento en la fosforilación de FAK (Figs. 4.4, 4.5).

Recientemente se ha determinado que FAK modula la actividad de Cdc42 por debajo de señales de guía axonal positivas (BDNF) y negativas (Slit) [129, 135]. Un aumento de la actividad de Cdc42 está correlacionada con la aparición de filopodios; en base a esta bibliografía y nuestros resultados, podemos hipotetizar que BDNF promueve la fosforilación de FAK, la cual activa Ack1 indirectamente, a través de Cdc42, para promover la ramificación axonal. En el caso en el que FAK esté inhibida, la activación de Ack1 no se puede producir. Debe existir, además, algún tipo de mecanismo de retroalimentación puesto que Ack1 debe estar a su vez activa para que se pueda llevar a cabo la activación de FAK, como hemos visto en la Fig. 4.5 del apartado de resultados. La confirmación de esta hipótesis requeriría una serie de experimentos que impliquen la participación de Cdc42, así como la dilucidación del mecanismo de retroalimentación aquí propuesto.

3. FAK y Ack1 responden a netrina-1.

Las netrinas son una familia de moléculas secretadas importantes para el desarrollo del SN. Las netrinas promueven el crecimiento axonal, guían el cono de crecimiento y regulan la ramificación neuronal. Presentan una función dual según el receptor al que se unan: la familia de receptores DCC es necesaria para la atracción del cono de crecimiento y para la repulsión mientras que la repulsión sobre el cono está mediada por la interacción de miembros de las familias DCC y UNC. Una serie de estudios han clarificado el mecanismo por el cual Net-1 induce crecimiento axonal y atracción [130-132]: en las neuronas, FAK y DCC interaccionan de manera constitutiva. Cuando Net-1 se une a DCC tiene lugar la activación y fosforilación de FAK, que recluta a miembros de la familia Src (Fyn) al complejo. El complejo FAK-Src activo fosforila DCC en tirosina. La

fosforilación en FAK inducida por netrina tiene lugar en residuos tirosina, aunque existe cierta controversia sobre la participación del residuo Y397 [131, 132]. El mecanismo por el cual se activa FAK parece ser un cambio conformacional causado por la unión de Net-1 a DCC: el dominio FERM cambia de conformación facilitando la accesibilidad al dominio kinasa. La netrina se adhiere al sustrato y genera un gradiente que es el que detectan las neuronas, en vez de un gradiente difusible como se había postulado hasta el momento [133]. El cono de crecimiento es capaz de ejercer fuerzas de tracción que “empujan” el axón. FAK actúa como un mecanosensor, y se activa directamente al detectar este tipo de fuerzas [133, 257].

Como acabamos de ver, la participación de FAK en la vía de señalización de netrina está bien definida. Nuestros resultados sugieren que FAK y Ack1 interaccionan, y la actividad de una es necesaria para la activación de la otra. Debido a la participación de FAK en la vía de netrina, quisimos comprobar si también Ack1 tiene un papel en la transducción de la señal. Los resultados muestran que tanto FAK como Ack1 se fosforilan en tirosinas tras la adición de Net-1 a cultivos primarios de neuronas de hipocampo (Fig. 4.5).

A la vista del efecto de Net-1 en la fosforilación de Ack1 en cultivos, decidimos estudiar el papel de Ack1 *in vivo*. Electroporando explantes de hipocampo con una construcción para inhibir la expresión de Ack1 comprobamos que esta proteína es necesaria para el efecto de crecimiento neurítico y atracción axonal ejercido por Net-1. Así, la ausencia de Ack1 da lugar a axones más cortos, y evita la atracción ejercida por Net-1, medida como PDi y como incremento de la longitud axonal. Estos resultados, unidos al anterior en relación con FAK, apunta a la hipótesis de que la función de atracción de Net-1, mediada por FAK, necesita también de la actividad de Ack1. Ambas proteínas son importantes reguladores del citoesqueleto y podrían tener un nexo de unión en Cdc42.

Capítulo 5: Análisis de FAK y Ack1 por MS.

La técnica de espectrometría de masas se utiliza frecuentemente para la identificación de proteínas y fosforilaciones en biología molecular. En este capítulo se describen los posibles interactores de FAK y Ack1, las distintas fosforilaciones en distintos estados de desarrollo o de actividad del cerebro y las posibles kinasas responsables, utilizando técnicas de MS.

Los resultados de espectrometría se deben analizar con cautela ya que las muestras son sometidas a diversos protocolos con el objeto de conseguir suficiente cantidad de proteína. Estos procedimientos pueden dar lugar a artefactos así como a la pérdida de información en la muestra, como de hecho se pone de manifiesto en la dificultad de obtener suficiente cantidad de proteína Ack1. Todos los resultados expresados en este capítulo deberían confirmarse posteriormente de manera individual. En base a los datos obtenidos, podemos concluir que tanto en el caso de FAK como en el de Ack1, la mayoría de las proteínas encontradas pertenecen al aparato sináptico.

Así, encontramos proteínas presinápticas, como sinapsina I y sinaptopodina, y postsinápticas, como varias proteínas de la familia SAPAPs y SynGAP. También hay proteínas implicadas en procesos de plasticidad, como NCAM y β -adducina, y en neuritogénesis y formación de espinas dendríticas, como drebrina, Grin1 y α -2-catenina. Es interesante comprobar la presencia de múltiples proteínas

relacionadas con el citoesqueleto (srGAP2, nemitina, SynGAP, Pap, amfifisina, β -espectrina), como corresponde al análisis de dos proteínas como FAK y Ack1, importantes moduladores del citoesqueleto (ver tabla 5.I del apartado de resultados).

Una de las proteínas que más nos ha llamado la atención es la drebrina. Esta proteína de unión a actina es responsable de la formación de espinas dendríticas e interacciona con moléculas esenciales de la densidad postsináptica, como homer y PSD95, que a su vez interaccionan con receptores NMDA, proporcionando de esta manera un *link* directo entre la actividad sináptica y la remodelación de espinas dendríticas. El papel de drebrina en la formación de espinas dendríticas viene apoyado porque la sobreexpresión de drebrina genera espinas anormalmente largas similares a filopodios inmaduros [180, 258], mientras que su inhibición provoca que haya espinas finas y dispersas [259]. En humanos, una disminución en la expresión de drebrina está relacionada con la enfermedad de Alzheimer [260].

Nuestros resultados podrían proporcionar nuevas moléculas involucradas en plasticidad sináptica, al relacionar drebrina con FAK y Ack1. El mecanismo de acción de drebrina se desconoce, pero se ha visto que requiere la activación de Ras. Como hemos visto, FAK es un regulador central del citoesqueleto, y su activación puede dar lugar a la activación de la vía de señalización Ras/ERK2 para promover la migración celular [98]. Por otro lado, Ras promueve la migración celular mediante la vía Cdc42/PAK/MEK/ERK, que inhibe FAK [110]. Ack1 activa ERK1/2 y Akt por la vía de las neurotrofinas [143].

La drebrina también juega un papel importante en migración neuronal, y es crucial para la formación y la guía del *leading process*, como se ha visto en estudios de migración tangencial en el núcleo oculomotor [182].

Otros interactores encontrados apoyan el papel sináptico de FAK y Ack1: la proteína CaMKII, crucial en procesos de aprendizaje, promueve migración celular y recambio de las adhesiones focales mediante la desfosforilación de FAK y paxilina [238]. Además, interacciona con drebrina y regula la formación de espinas dendríticas. Cdc42 controla la formación de espinas dendríticas por debajo del receptor EphB2, induciendo la polimerización de actina a través de WASP y Arp2/3 [261]. Recientemente se ha relacionado Cdc42 con plasticidad sináptica mediante la remodelación de espinas dendríticas [262]. Como sabemos, Cdc42 es un importante componente en la vía tanto de FAK como de Ack1. Estos resultados sugieren la participación de FAK y Ack1 en plasticidad y de nuevo apoyan la hipótesis de Cdc42 como el posible nexo entre FAK y Ack1.

Los datos obtenidos apoyan la localización pre- y post-sináptica tanto de FAK y Ack1, definida anteriormente [144, 263].

Es muy llamativa la ausencia de FAK en la inmunoprecipitación para MS de Ack1 y viceversa. Esto es sorprendente puesto que anteriormente habíamos determinado claramente la co-inmunoprecipitación en lisados de cerebro (Fig. 4.1). Una explicación plausible es que la sensibilidad de la técnica de WB es muy alta, mientras que la MS tiene un umbral de detección mucho mayor y se necesita mucha cantidad de proteína.

Realizando un enriquecimiento en fosfopéptidos de las mismas muestras descritas en el apartado anterior (P5, control y PTZ), hemos encontrado varios residuos fosforilados de manera diferente en las condiciones analizadas. Así, en el caso de FAK, se han encontrado varias diferencias de fosforilación en estas condiciones; de ellas, las fosforilaciones cuya función es conocida (o de las que se tiene algún tipo de información *in vivo*) son S722, S840, S843 y Y925 (tabla 5.II de resultados).

La **S722** está implicada en la unión de FAK a p130Cas [264], y se encuentra fosforilada sólo en animales P5. La unión de FAK a p130Cas resulta en su fosforilación en tirosinas, creando dominios SH2 a los que se une la proteína adaptadora Crk. Esto da lugar a activación de Rac, incremento en la formación de lamelipodios y promoción de la migración celular [98].

La **S840** se ha encontrado fosforilada en células mitóticas, y actúa como sitio de unión de PKA [264]. La encontramos fosforilada en animales control y PTZ, pero no en P5.

La **S843** incrementa su fosforilación en células en mitosis [264]. En respuesta a receptores acoplados a proteínas G tiene lugar un rápido incremento en la fosforilación de S843 mediado por Ca^{2+} /calmodulin/CaMKII en fibroblastos [265]. Su fosforilación ejerce un efecto inhibitorio sobre la fosforilación del residuo Y397 [266] y se da de manera independiente a ella [240]. En SN, se ha visto que la fosforilación de este residuo por CaMKII juega un papel crucial en la inhibición del crecimiento axonal inducido por ATP/ Ca^{2+} [254]. Nuestros resultados muestran que está fosforilado sólo en P5.

El residuo **Y925**, una vez fosforilado, crea un sitio SH2 de unión de proteínas como Grb2, que inicia la cascada Ras/Erk2. Su fosforilación desplaza FAK de las adhesiones focales [98] y es necesaria para la migración celular [267]. En el SN, es fosforilado en respuesta a Net-1 [131] y Sema3A [79]. En este caso, su fosforilación está implicada en procesos opuestos, puesto que Net-1 media atracción mientras que la Sema3A repulsión. Nosotros lo encontramos desfosforilado en P5 y fosforilado en el adulto.

No encontramos fosforilado el residuo Y397, que hasta ahora se asume como el primer paso en la fosforilación de FAK. Esto se debe a que el péptido que lo contiene no es detectado por el espectrómetro, ya que la digestión enzimática genera un péptido muy grande y cargado negativamente que no se ioniza bien.

Es muy complejo identificar el papel de FAK en función de la fosforilación de un residuo individual, siendo el conjunto lo que proporciona una determinada función u otra. El aspecto importante de nuestros resultados es la identificación de nuevos sitios de fosforilación de FAK en cerebro, con funciones importantes en diferentes aspectos como el desarrollo o una alta actividad neuronal. La función individual de cada residuo deberá ser confirmada mediante análisis funcionales *in vivo*.

En el caso de Ack1, la identificación de los residuos fosforilados en cerebro es si cabe más relevante puesto que el conocimiento sobre las funciones de esta proteína es mucho más limitado que el de FAK. Nuestros resultados muestran tres fosforilaciones en P5: T113, S772 y S826, siendo esta última descrita por primera vez en el presente trabajo.

Por último, el análisis *in silico* de las kinasas que podrían ser responsables de algunas de estas fosforilaciones arroja un resultado interesante: en ambas proteínas aparece la glucógeno-sintasa kinasa 3 (GSK3) como posible kinasa de los residuos T914 de FAK y S772 de Ack1. La proteína GSK3 se encuentra en la vía de señalización PI3K/Akt. Se ha comprobado que PI3K, en respuesta a NGF, estimula la ramificación neurítica mediante la inhibición de GSK3 [138]. La inhibición de PI3K/Akt, que hace que GSK3 esté activa, media la inhibición del crecimiento axonal inducido por Ca^{2+} [254]. El hecho de que aparezca como posible kinasa reguladora de FAK y Ack1, un papel desconocido hasta ahora, apoya la hipótesis de la participación de ambas proteínas en procesos de ramificación neuronal.

CONCLUSIONES

- 1.** La semaforina transmembranal 4F (Sema4F) se expresa en neuronas, oligodendrocitos y sus precursores durante el desarrollo del sistema nervioso.
- 2.** Sema4F inhibe la migración de precursores de oligodendrocitos (OPCs) de nervio óptico e induce su diferenciación a oligodendrocitos maduros, sin afectar a su proliferación.
- 3.** FAK presenta un patrón de fosforilación específico de tipo celular en el cerebro, encontrándose distintas combinaciones de residuos fosforilados a nivel basal en astrocitos, OPCs y neuronas.
- 4.** Sema4F induce la fosforilación de FAK en OPCs, lo que podría formar parte del mecanismo de acción de esta semaforina, si bien nuestros datos no excluyen otras posibilidades.
- 5.** FAK presenta varias isoformas que se expresan preferentemente en cerebro. De ellas, la más abundante en hipocampo y corteza entorrinal es la que incluye las cajas de 3, 6 y 7 aminoácidos. El análisis de la expresión de las distintas isoformas en neuronas, astrocitos y OPCs no muestra diferencias notables en función del tipo celular.
- 6.** Las proteínas intracelulares FAK y Ack1 interactúan específicamente en neuronas. La fosforilación de FAK es necesaria para la activación de Ack1, y FAK requiere de la expresión de Ack1 para su fosforilación.
- 7.** Tanto FAK como Ack1 responden a Net-1 mediante un incremento en su fosforilación en tirosinas. La inhibición de la expresión de Ack1 en explantes de hipocampo contrarresta la quimioatracción ejercida por Net-1.
- 8.** El estudio de la interacción entre FAK y Ack1 mediante espectrometría de masas (MS) apoya su localización sináptica y muestra la proteína asociada a espinas dendríticas drebrina como uno de los principales interactores de ambas.
- 9.** El patrón de fosforilación de FAK determinado por MS varía en función del estado de desarrollo o de actividad global del cerebro. Hemos encontrado nuevos residuos fosforilables no descritos previamente tanto en FAK como en Ack1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los ratones usados de la cepa OF-1 se mantuvieron en el animalario de la *Unitat d'Experimentació Animal de Biologia*, Universitat de Barcelona; los ratones de la cepa transgénica plp-GFP se mantuvieron en el animalario del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo. Los animales se estabularon y manejaron de acuerdo con la Directiva de la Comunidad Europea 86/609/EEC.

Generación de anticuerpos

Se construyó un péptido sintético correspondiente a los aa 567-587 de Sema4F de rata y ratón, que se acopló a KLH para la inmunización de un conejo siguiendo métodos estándar [268]. La fracción IgG del suero se purificó y se denominó anti-4F. Después fue testada en nuestro laboratorio (Figs. 1.2B-D). El anticuerpo monoclonal anti-Ack1 se generó a partir de una proteína de fusión GST contra la zon PR de la proteína, por la compañía Leitat, Barcelona. La generación del anticuerpo policlonal anti-Ack1 se describe en Urena et al 2005 [143].

Anticuerpos utilizados

En esta tesis se usaron los siguientes anticuerpos: anti-Sema4F (conejo, generado en el laboratorio), anti-CFAK (conejo, Sta. Cruz), anti-NFAK (conejo, Sta. Cruz), anti-PY397FAK (ratón, Sta. Cruz), anti-PY925FAK (cabra, Sta. Cruz), anti-Ack1 (ratón y conejo), anti-A2B5 (ratón, clon 105 de ATCC), anti-Olig-2 (ratón, Chemicon), anti-MBP (ratón, Chemicon), anti-GFAP (ratón, MAB360 Millipore), anti-vimentina (cabra, Sta. Cruz), anti-drebrina (ratón M2F6, Abcam), anti-PserGSK3 (conejo 5B3, Cell Signaling), anti-GSK3 (ratón, 4G-1E, Millipore), anti-PERK (conejo, 9101S Cell Signaling), anti-ERK (ratón 610123, BD), anti-BrdU (ratón, G3G4, DHSB) anti-GFP (conejo, Molecular Probes), anti-GAPDH (ratón, 4300 Ambion), anti-actina (ratón, 9271S Cell Signaling), anti-tubulina (tuj-1, ratón Covance), anti-fosfo-tirosina (ratón, clon 4G10, Millipore), anti-Myc (ratón, 9E10, Sta. Cruz).

Histología

Los animales se perfundieron con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.12M (pH 7.4), y sus cerebros se infiltraron con sacarosa y se congelaron en hielo seco. Se cortaron en secciones coronales de 40 μ m de grosor, que se mantuvieron hasta su uso a -70°C en solución crioprotectora (30% glicerol, 30% etilenglicol, 40% PBS 0.1M).

Ensayos de IHC

La inmunohistoquímica se realizó siguiendo nuestros protocolos habituales [173, 269]. Brevemente, las secciones de cerebro se lavaron en PBS, después se permeabilizaron en PBS-Triton X-100, se bloquearon durante 2 horas en 10%FBS ó NGS-0.1% Tritón X-100 en PBS-0.2% gelatina y se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios, según experimento, durante toda la noche a 4°C, en solución de incubación (5%FBS ó NGS-0.1% Tritón X-100 en PBS-0.2% gelatina). Posteriormente se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) en solución de bloqueo durante 2 horas y con el complejo de estreptavidina-peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech) durante 2 horas más. Las secciones fueron reveladas con diaminobenzidina (DAB) al 0,03% y peróxido de hidrógeno al 0,02%, extendidas sobre portas, deshidratadas y montadas con Eukitt.

En el caso de los marcajes dobles fluorescentes, se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos (Alexa Fluor 488, 568 o 633, Life Technologies), y DAPI (Sigma) como marcador específico de núcleos. Se montaron en portas con Mowiol

Ensayos de ISH

Los experimentos de hibridación *in situ* en secciones flotantes se realizaron como se ha descrito previamente [269, 270]. Los oligonucleótidos se marcaron con UTP-digoxigenina (Roche) mediante transcripción *in vitro* de un fragmento de cDNA que codifica para la mitad extracelular de Sema4F de rata [94]. Las ISH se revelaron con *nitroblue tetrazolium* y 5-bromo-4-cloro-3-indoílfosfato (NBT y BCIP, Life Technologies).

Inmunocitoquímica

Las células se fijaron en paraformaldehído 4%, permeabilizaron con Tritón X-100 en PBS y bloquearon con tampón de bloqueo (10% FBS y 0,1% Tritón X-100 en PBS-0,2% gelatina ó PBS) durante 2h a temperatura ambiente. Para marcar las células se utilizaron diferentes anticuerpos primarios, según cada experimento, en tampón de incubación (5%FBS-0.1% Tritón X-100 en PBS-0.2% gelatina) durante toda la noche y con los correspondientes anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos (AlexaFluor 488, 546 ó 568, Life Technologies). En el caso de los OPCs teñidos con A2B5 se omitió el detergente en todo el procedimiento. Los núcleos fueron marcados con el marcador DAPI y las muestras se montaron en Mowiol.

Transfecciones

Se transfectaron células COS1 y 293T con vectores de expresión codificantes para la Sema4F de rata bien entera o truncada (Sema4Fe, parte extracelular que contiene el dominio Sema más el dominio IgG), acoplados al epítipo Myc en su parte C-terminal. Como permeante se usó Lipofectamina Plus (Life Technologies) o bien XtremGene (Roche), a las condiciones recomendadas por el fabricante. Para la obtención de medio condicionado, se mantuvieron en medio DMEM (Life Technologies) suplementado con FBS 10%, glutamina 0.5% y penicilina/estreptomicina 1% durante 3 días y en OM-1 (Life Technologies) durante 3 días más. Entonces se recogió el medio, se filtró y se concentró usando columnas de 30K de Amicon (Millipore). Se testó la presencia de Sema4F en el medio mediante WB.

En el caso del medio condicionado netrina, se usaron células 293T transfectadas establemente con un vector de expresión de netrina que lleva el epítipo myc. Estas células mantienen la expresión de netrina 1 y se seleccionan con los antibióticos geneticina e higromicina. Las células se sembraron a confluencia en medio OM-1 y varios días después se recogió y filtró el medio. Se testó la presencia de Net-1 mediante WB o dot-blot.

Para la transfección de cultivos primarios de hipocampo con los shRNA de FAK y Ack1, se plantaron 9×10^5 neuronas por pocillo coatinizado con poli-D-lisina (Sigma), y tres días después se transfectaron con 1µg de cada DNA, utilizando Lipofectamina 2000 (Life Technologies) y, siguiendo las instrucciones del fabricante. 3 días después se fijaron las neuronas con paraformaldehído 4% y se procedió a su inmunoanálisis.

Inmunoprecipitación

Las células se lisaron en tampón de lisis (HEPES 50mM pH 7.5, NaCl 150mM, MgCl₂ 1.5mM, EGTA 1mM, Glicerol 10%, Tritón X-100 1%) completo (NaF, Na₃VO₄, Na₂H₂P₂O₇, cóctel de inhibidores de proteasas-Roche) Los lisados se incubaron con el anticuerpo durante toda la noche a 4°C y después con proteína G-sefarosa (Sigma) durante 90min a 4°C, previamente bloqueada con PBS-BSA5% durante una noche. Tras lavar en tampón de lisis varias veces se resuspendieron en tampón de lisis completo. Las cuantificaciones se llevaron a cabo mediante el kit BCA (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Estudios de microscopía electrónica

Para la inmunotinción pre-inclusión, se perfundieron ratones adultos (NMRI, n=2) con paraformaldehído 2% y glutaraldehído 0.5% en tampón fosfato 0.12M. Una vez extraídos los cerebros, se post-fijaron con paraformaldehído 2% en tampón fosfato 0.12M durante una noche. Los cortes se llevaron a cabo con un vibrátomo como se ha descrito anteriormente, excepto que se omitió el detergente Tritón X-100 y las incubaciones se realizaron a 4°C. Las secciones marcadas que contenían hipocampo, corteza o cerebelo se post-fijaron con tetróxido de osmio 2%, se tiñeron con acetato de uranilo 2% y se incluyeron en araldita. Se recogieron cortes ultrafinos en rejillas cubiertas de formvar y se tiñeron con citrato de plomo.

Cultivos de OPCs

Las células precursoras se obtuvieron del cerebro anterior de ratas neonatales OF-A. Brevemente, el tejido cortical se diseccionó en HBSS (con Ca²⁺ y Mg²⁺) y se digirió a 37°C con tripsina y DNasa-I (Roche) en HBSS (sin Ca²⁺ ni Mg²⁺). Después de la centrifugación, las células se resuspendieron en 10 ml de DMEM con 10% de suero bovino fetal y antibióticos (medio DMEM). Esta suspensión se filtró (100µm, BD -Falcon) y las células se plantaron en *flasks* de 75 cm² previamente tratados con poli-L-ornitina (Sigma), cambiando el medio cada 3 días.

Ensayos de migración de OPCs

Los explantes de nervio óptico se obtuvieron de ratones OF-1 E16 según se ha descrito [50, 60, 169, 271]. La migración en matriz de colágeno se realizó como en [50, 60, 169, 271], excepto que en este caso se cultivaron los explantes en medio condicionado enriquecido en Sema4Fe, medio condicionado control, IgG anti-4F o IgG preinmune. La proteína recombinante Sema4Fe corresponde a una forma truncada de Sema4F de rata que incluye los dominios Sema e inmunoglobulina unidos a un epítipo Myc C-terminal. A los 3 días *in vitro* (3d.i.v.) se fijaron en paraformaldehído 4% y se inmunotiñeron para A2B5 y DAPI. El análisis del número de células migratorias se llevó a cabo mediante un microscopio automatizado invertido de fluorescencia (programa Cell[^]R, TIRF) y una macro en lenguaje Fiji diseñada específicamente.

Para los vídeos de migración, se sembraron 3-4 explantes por pocillo en poli-L-Ornitina más laminina y se añadió medio condicionado 4F o control justo antes de grabar, usando el programa Cell[^]R del microscopio TIRF.

Ensayos de diferenciación de OPCs

Los OPCs de cerebro anterior de ratas neonatales obtenidos como se ha descrito anteriormente se llevaron a confluencia de 80-90% y entonces se purificaron siguiendo el método “shake-off” descrito previamente [272]. Brevemente, los cultivos se agitaron a 250rpm a 37°C durante toda la noche y el sobrenadante se filtró (40µm) y centrifugó a 800rpm. Se sembraron aproximadamente 10⁶ células por pocillo en cubreobjetos previamente forrados (con poli-D-lisina más medio condicionado Sema4F, poli-D-lisina más medio condicionado control o poli-D-lisina sola), y se mantuvieron 3 días en el incubador para su diferenciación, en medio DMEM sin suero suplementado con T3, T4, putrescina, progesterona y selenito sódico (Roche). Las células se fijaron y tiñeron usando anti-MBP (Millipore) y DAPI. El porcentaje de células diferenciadas respecto al número total de células para las tres condiciones se expresó como el ratio de la densidad MBP/el número de células teñidas con DAPI, datos obtenidos mediante un microscopio de fluorescencia automatizado (programa ScanR, TIRF) y un programa diseñado para el análisis en lenguaje Fiji.

Ensayo de proliferación de BrdU.

La incorporación de BrdU se determinó mediante el protocolo descrito en Spassky et al 2002, con ligeras modificaciones. Se añadió BrdU 50 µM a los cultivos durante 6-24h. Su incorporación se visualizó con un anticuerpo monoclonal contra BrdU (G3G4, DHSB) diluido 1:5 en una solución de gelatina 0.2%, Tritón X-100 0.3% y FBS 5% en PBS, a pH 7.4.

Cultivos en cámaras de quimiotaxis.

Los estudios de migración de OPCs se realizaron en cámaras “transwell” con membranas de policarbonato (tamaño de poro: 8µm, Corning Costar) usando una versión del protocolo descrito en Frost et al 1996. El quiasma y los nervios ópticos se disociaron en DMEM con papaína 1.14U/ml (Worthington, Serlabo), colagenasa 12% (Sigma-Aldrich) y cisteína 0.48 mg/ml (Sigma-Aldrich). Las membranas primero se forraron con poli-L-lisina (10µg/ml) en tampón borato durante 1h a 37°C, se lavaron dos veces con agua y después se forraron con laminina (10µg/ml). En la cámara superior de cada pocillo se sembraron 5x10⁴ células en medio BS. Para bloquear la Sema4F endógena de los OPCs, las células del nervio óptico se preincubaron durante 1h a 37°C con tres concentraciones de anti-4F: 1:500, 1:250 y 1:100. Después de una incubación de 18h a 37°C, se eliminaron las células no-migratorias de la superficie superior de la membrana mediante un bastoncillo de algodón y las células migratorias de la parte inferior de la membrana se fijaron con paraformaldehído 4%. Para identificar las células del linaje oligodendroglial, aquellas que habían transmigrado a la parte inferior del filtro se inmunotiñeron con A2B5 (clon 105 de ATCC, 1:10) y Olig-2 (Chemicon; 1:200; [255]).

Para el análisis cuantitativo, las membranas se observaron con un microscopio Leica usando un objetivo 20x. Para cada pocillo se seleccionaron aleatoriamente 10 campos y se contó el número (± SEM) de células A2B5+/Olig-2+ por mm². Se realizaron tres experimentos independientes.

Hibridación con sondas marcadas radiactivamente

El RNA de los cerebros se extrajo mediante el protocolo de purificación con Trizol y cloroformo. Su concentración y estado se determinaron mediante análisis del servicio de genómica del IRB-Barcelona mediante RNA NanoKit y Bioanalyzer (Agilent). 2µg de RNA se precipitaron con LiCl toda la noche a -20°C y se retrotranscribieron a cDNA usando la retrotranscriptasa MoMLV (New

England Biolabs) y los cebadores o “primers” “antisense” F-3387 y F-1744 (Invitrogen). Se amplificó la región de FAK por PCR, usando los “primers” F+1540 y F-1744 (dirigidos para amplificar el gen *ptk2* completo) o bien los “primers” F+3033 y F-3387 (dirigidos contra la caja PWR) (Life Technologies).

F-1744: TGATGTACATCTCCAAACTG (20 mer)

F+1540: TGCCATCAATACCAAAGTTG (20 mer)

F-3387: TCTTCTGGAGGAGCTGG (17mer)

F+3033: GATCCTGCAGCTCCACC (17mer)

El resultado de la PCR se analizó en un gel de acrilamida/bisacrilamida 1.5%. El gel se transfirió y fijó siguiendo la técnica de “Southern Blot,” descrita previamente. La membrana se hibridó con sondas que detectan cajas o combinaciones específicas de cajas:

Sondas:

B28: GTTGGAGGAGGTTCAAGAGA

B6: GTCTCGTCCCCACTAATTTTC

B7: GGCTTCATCTATTCCATAGC

N+390: TCTGTGTCAGAGACAGATGA

N+393: GAGACAGATGACTATGCCGA

(+)PWR: GGTGTCAAGCCGTGGAGGCTTCAGCCC

NO PWR: ATGAGGGTGTCAAGCTTCAGCCCCAGG

Las sondas se marcaron con ^{32}P mediante una reacción de fosforilación con la enzima T4-Polinucleótido Kinasa (T4-PNK, New England Biolabs), que cataliza la transferencia del fosfato terminal del $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ al extremo 5'OH del DNA. Las sondas marcadas se incubaron durante 1h en tampón de hibridación Express Hyb (a 37°C para sondas cortas: B6, B6, B28, N+390 y N+393 y a 42°C para sondas largas: PWR y NO PWR) (Clontech) y se lavaron con tampón SSC2x/0.1% SDS durante a temperatura ambiente y 42°C (sondas cortas) o temperatura ambiente y 65°C (sondas largas). El revelado se llevó a cabo exponiendo una pantalla a las membranas y revelándola con el Typhoon Scanner.

Las bandas se analizaron mediante los programas ImageQuant Software (Molecular Dynamics) y Fiji/ ImageJ [273].

Cultivos primarios de hipocampo

A partir de embriones E16 de ratón OF-1, se extrajo el cerebro y se obtuvieron los hipocampos, en medio de disección PBS-glucosa 3%. Se digirieron con tripsina y con DNasa I (Roche). Después de centrifugar, se resuspendió el pellet en medio Neurobasal suplementado con penicilina/estreptomicina 1% (Life Technologies), glutamax 1% (Life Technologies) y B27 2% (Life Technologies). Para los cultivos de alta densidad, sembramos 2×10^6 células por pocillo en placas tratadas con poli-D-lisina (0.5mg/ml). Para los cultivos de baja densidad, sembramos 1.5×10^5 o 0.9×10^5 células por pocillo, tratado previamente con poli-D-lisina (5mg/ml).

Para estudiar el efecto de la ausencia de FAK en la fosforilación de Ack1, sembramos 2×10^6 neuronas de hipocampo por pocillo y 3 d.i.v. después tratamos durante 1h con DMSO o con PF-228. Justo inmediatamente después, 1 día después o 3 días después lisamos los cultivos con tampón de lisis. En paralelo, repetimos el experimento pero estimulando con Na_3VO_4 y H_2O_2 durante 30 minutos o con BDNF durante 15 minutos previamente a la lisis. Los lisados se inmunoprecipitaron con anti-Ack1 y se sometieron a SDS-PAGE para revelar después el WB con anti-Ack1 y anti-PTyr.

El tratamiento de cultivos de hipocampo para estudiar la fosforilación de FAK en ausencia de Ack se realizó infectando 10^6 células por pocillo con una dilución 1:10 de lentivirus de shAck1 con

titulación de 10^7 unidades. 6 d.i.v. después se privaron durante 3h y se estimularon (o no, según la condición) con Na_3VO_4 y H_2O_2 durante 30 minutos. Después se lisaron con tampón de lisis y se inmunoprecipitaron con anti-FAK, revelando después el WB con anti-Ptyr ó anti-FAK.

La genisteína (Sigma) se usó a una concentración final de $1\mu\text{M}$.

El tratamiento con netrina de cultivos primarios de hipocampo se realizó utilizando medio condicionado de Net-1 (ver más arriba) o medio control, recogido en OM-1. Se añadió $400\mu\text{l}$ a cada pocillo de placa de 6 para llegar a un volumen final de 2ml.

Electroporación de explantes de hipocampo

A partir de embriones E15 de ratón OF-1 se extrajo el hipocampo en medio PBS-Glucosa 3%. Se obtuvieron unos 10 explantes por hipocampo y se electroporaron con $3\text{--}6\mu\text{g}$ de DNA. Para la electroporación se usó en Neon Transfection System (Life Technologies), con los parámetros siguientes: Voltaje: 500V; Anchura: 50ms; Número de pulsos: 5. Para cada experimento, se electroporó un vector GFP como control positivo, un vector *scrambled* como control negativo, y el shRNAi correspondiente. Las construcciones de FAK (Sh78, sh79, sh80 y sh81), clonadas en el vector de expresión pVRS-GFP, se obtuvieron de Origene. Las construcciones de Ack1 se obtuvieron de Sigma Mission en el vector plk0.1. Las dos que mejor funcionaron (sh50 y sh52) se reclonaron en un vector que expresaba GFP, pdsL para sh50 y plk0.3G para sh52. Además, se clonaron dos *scrambled* aleatorios en cada uno de los vectores, como control.

Los explantes se sembraron en una matriz tridimensional de colágeno-I comercial (BD) enfrentados a “churros” de células 293T control o bien a células 293T que secretan Net-1 de manera constitutiva. Tras 48h a 37°C , se fijaron con paraformaldehído 4% y se llevó a cabo una ICC como se ha descrito anteriormente, con los anticuerpos anti-GFP y anti-tuj.

El análisis de los explantes de hipocampo transfectados se llevó a cabo mediante un microscopio automatizado invertido de fluorescencia TIRF (Olympus) y una macro en lenguaje Fiji [273] diseñada especialmente para el experimento. Se definió el índice Proximal/Distal (PDi) para cada explante como el número de axones de la mitad proximal dividido por el número de axones de la mitad distal. Un $\text{PDi}=1$ indica crecimiento radial, y un $\text{PDi}>1$ indica atracción hacia la fuente de células. La longitud axonal se midió con el plugin para FIJI NeuronJ.

La estadística se realizó mediante el software Prism (GraphPad), usando un t-test con corrección de Welch.

Obtención de muestras para espectrometría de masas (MS)

Entre 3-4 ratones adultos por grupo se inyectaron con PTZ (pentilentetrazol, Sigma) o PBS para el control. La primera inyección fue de 30mg/kg y las siguientes, hasta provocar una crisis epiléptica, de 10mg/kg cada 15 min. Diez minutos después de la crisis se sacrificó el animal y se le extrajo el cerebro.

Los cerebros de ratones P5 (una camada) o adultos se homogenizaron en un volumen de tampón de lisis completo de 5 veces su peso. Después de 20 min. en hielo se centrifugaron a 4°C y el sobrenadante se incubó toda la noche con el anticuerpo (FAKN ó Ack1) a 4°C . Después se incubaron las muestras con proteína G-sefarosa previamente bloqueada durante 2h a 4°C y tras lavarlas se resuspendieron en tampón de lisis completo y se incubaron con acetona toda la noche a -20°C . Después de centrifugar, se incubó con glicina 0.1M pH2 para separar las proteínas de la proteína G-sefarosa durante 5 minutos en agitación. Se neutralizó con 0.1 volúmenes de Tris 1M pH8.5 y se concentró la muestra con columnas Amicon (Millipore) hasta obtener un volumen máximo de $50\mu\text{l}$.

Toda la muestra se cargó en un gel de Acrilamida/Bisacrilamida 8% y se sometió a SDS-PAGE. Tras fijar y teñir las muestras durante toda la noche a 4°C con SyproRuby (Molecular Probes), se cortó la banda a la altura correspondiente a FAK o Ack1 y se entregó al servicio de proteómica del IRB-Barcelona

Espectrometría de Masas (LC-MS/MS)

Las bandas del gel se digirieron con tripsina (Promega) y la muestra resultante se enriqueció en fosfopéptidos mediante bolas magnéticas con óxido de titanio (TiO₂, GE Healthcare). La muestra se analizó después mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas y los datos se analizaron en el programa Proteome Discoverer (v.1.2.0.208). Todo este procedimiento se llevó a cabo por el servicio de proteómica del IRB-Barcelona.

El análisis de las kinasas putativas se llevó a cabo con el programa Scansite [274]. Se utilizaron parámetros de astringencia media, lo que indica que el motivo identificado en la secuencia problema se encuentra dentro del 1% de todas las secuencias con las que coincide en la base de datos SwissProt de vertebrados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Corbin, J.G., S. Nery, and G. Fishell, *Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain*. Nat Neurosci, 2001. **4 Suppl**: p. 1177-82.
2. Ge, S., et al., *Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus*. J Physiol, 2008. **586**(16): p. 3759-65.
3. Rowitch, D.H. and A.R. Kriegstein, *Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification*. Nature, 2010. **468**(7321): p. 214-22.
4. Tramontin, A.D., et al., *Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment*. Cereb Cortex, 2003. **13**(6): p. 580-7.
5. Spassky, N., et al., *Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis*. J Neurosci, 2005. **25**(1): p. 10-8.
6. Hakanen, J., S. Duprat, and M. Salminen, *Netrin1 is required for neural and glial precursor migrations into the olfactory bulb*. Dev Biol, 2011. **355**(1): p. 101-14.
7. Conover, J.C. and R.L. Allen, *The subventricular zone: new molecular and cellular developments*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(12): p. 2128-35.
8. Tissir, F. and A.M. Goffinet, *Reelin and brain development*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(6): p. 496-505.
9. Le Bras, B., et al., *Oligodendrocyte development in the embryonic brain: the contribution of the plp lineage*. Int J Dev Biol, 2005. **49**(2-3): p. 209-20.
10. Karadottir, R., et al., *Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter*. Nat Neurosci, 2008. **11**(4): p. 450-6.
11. Nedergaard, M. and A. Verkhratsky, *Artifact versus reality--how astrocytes contribute to synaptic events*. Glia, 2012. **60**(7): p. 1013-23.
12. Gonzalez-Perez, O. and A. Alvarez-Buylla, *Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor*. Brain Res Rev, 2011. **67**(1-2): p. 147-56.
13. Raff, M.C., R.H. Miller, and M. Noble, *A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium*. Nature, 1983. **303**(5916): p. 390-6.
14. Herrera, J., et al., *Embryonic-derived glial-restricted precursor cells (GRP cells) can differentiate into astrocytes and oligodendrocytes in vivo*. Exp Neurol, 2001. **171**(1): p. 11-21.
15. Miron, V.E., T. Kuhlmann, and J.P. Antel, *Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(2): p. 184-93.
16. Baumann, N. and D. Pham-Dinh, *Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 871-927.
17. McTigue, D.M. and R.B. Tripathi, *The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS*. J Neurochem, 2008. **107**(1): p. 1-19.
18. Lin, S.C. and D.E. Bergles, *Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus*. Nat Neurosci, 2004. **7**(1): p. 24-32.
19. Emery, B., *Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination*. Science, 2010. **330**(6005): p. 779-82.
20. Fields, R.D., *Oligodendrocytes changing the rules: action potentials in glia and oligodendrocytes controlling action potentials*. Neuroscientist, 2008. **14**(6): p. 540-3.

21. de Castro, F. and A. Bribian, *The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development*. Brain Res Brain Res Rev, 2005. **49**(2): p. 227-41.
22. Miller, R.H. and K. Ono, *Morphological analysis of the early stages of oligodendrocyte development in the vertebrate central nervous system*. Microsc Res Tech, 1998. **41**(5): p. 441-53.
23. Hardy, R.J. and V.L. Friedrich, Jr., *Oligodendrocyte progenitors are generated throughout the embryonic mouse brain, but differentiate in restricted foci*. Development, 1996. **122**(7): p. 2059-69.
24. Girolamo, F., et al., *Characterization of oligodendrocyte lineage precursor cells in the mouse cerebral cortex: a confocal microscopy approach to demyelinating diseases*. Ital J Anat Embryol, 2010. **115**(1-2): p. 95-102.
25. Raff, M.C., et al., *Galactocerebroside is a specific cell-surface antigenic marker for oligodendrocytes in culture*. Nature, 1978. **274**(5673): p. 813-6.
26. Pfeiffer, S.E., E. Barbarese, and S. Bhat, *Noncoordinate regulation of myelinogenic parameters in primary cultures of dissociated fetal rat brain*. J Neurosci Res, 1981. **6**(3): p. 369-80.
27. Bribian, A. and F. de Castro, *[Oligodendrocytes: their embryonic origin, migration and therapeutic implications]*. Rev Neurol, 2007. **45**(9): p. 535-46.
28. Lin, S.C., et al., *Climbing fiber innervation of NG2-expressing glia in the mammalian cerebellum*. Neuron, 2005. **46**(5): p. 773-85.
29. Richardson, W.D., et al., *NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy?* Neuron, 2011. **70**(4): p. 661-73.
30. Doretto, S., et al., *Oligodendrocytes as regulators of neuronal networks during early postnatal development*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19849.
31. Cayre, M., P. Canoll, and J.E. Goldman, *Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain*. Prog Neurobiol, 2009. **88**(1): p. 41-63.
32. Marin, O., et al., *Guiding neuronal cell migrations*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(2): p. a001834.
33. Hatten, M.E., *Central nervous system neuronal migration*. Annu Rev Neurosci, 1999. **22**: p. 511-39.
34. Marin, O. and J.L. Rubenstein, *Cell migration in the forebrain*. Annu Rev Neurosci, 2003. **26**: p. 441-83.
35. Huang, Z., *Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development*. Mol Cell Neurosci, 2009. **42**(1): p. 11-22.
36. Kuo, G., et al., *Absence of Fyn and Src causes a reeler-like phenotype*. J Neurosci, 2005. **25**(37): p. 8578-86.
37. Govek, E.E., M.E. Hatten, and L. Van Aelst, *The role of Rho GTPase proteins in CNS neuronal migration*. Dev Neurobiol, 2011. **71**(6): p. 528-53.
38. Cocas, L.A., et al., *Emx1-lineage progenitors differentially contribute to neural diversity in the striatum and amygdala*. J Neurosci, 2009. **29**(50): p. 15933-46.
39. Marin, O., M. Valdeolmillos, and F. Moya, *Neurons in motion: same principles for different shapes?* Trends Neurosci, 2006. **29**(12): p. 655-61.
40. Kawauchi, T. and M. Hoshino, *Molecular pathways regulating cytoskeletal organization and morphological changes in migrating neurons*. Dev Neurosci, 2008. **30**(1-3): p. 36-46.
41. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.

42. Schoenwaelder, S.M. and K. Burridge, *Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(2): p. 274-86.
43. Hall, A. and G. Lalli, *Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(2): p. a001818.
44. Eickholt, B.J., F.S. Walsh, and P. Doherty, *An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling*. J Cell Biol, 2002. **157**(2): p. 211-7.
45. Ito, Y., et al., *Sema4D/plexin-B1 activates GSK-3beta through R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse*. EMBO Rep, 2006. **7**(7): p. 704-9.
46. Hur, E.M. and F.Q. Zhou, *GSK3 signalling in neural development*. Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(8): p. 539-51.
47. Richardson, W.D., N. Kessaris, and N. Pringle, *Oligodendrocyte wars*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(1): p. 11-8.
48. Ortega, M.C., et al., *Neuregulin-1/ErbB4 signaling controls the migration of oligodendrocyte precursor cells during development*. Exp Neurol, 2012. **235**(2): p. 610-20.
49. Miller, R.H., *Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS*. Prog Neurobiol, 2002. **67**(6): p. 451-67.
50. Spassky, N., et al., *Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1*. J Neurosci, 2002. **22**(14): p. 5992-6004.
51. Tsai, H.H. and R.H. Miller, *Glial cell migration directed by axon guidance cues*. Trends Neurosci, 2002. **25**(4): p. 173-5; discussion 175-6.
52. Frost, E., et al., *Regulation of oligodendrocyte precursor migration by extracellular matrix: evidence for substrate-specific inhibition of migration by tenascin-C*. Dev Neurosci, 1996. **18**(4): p. 266-73.
53. Kiernan, B.W., et al., *Tenascin-C inhibits oligodendrocyte precursor cell migration by both adhesion-dependent and adhesion-independent mechanisms*. Mol Cell Neurosci, 1996. **7**(4): p. 322-35.
54. Czopka, T., et al., *Regulatory mechanisms that mediate tenascin C-dependent inhibition of oligodendrocyte precursor differentiation*. J Neurosci. **30**(37): p. 12310-22.
55. Zhang, H., et al., *A role for the polysialic acid-neural cell adhesion molecule in PDGF-induced chemotaxis of oligodendrocyte precursor cells*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 1): p. 93-103.
56. Prestoz, L., et al., *Control of axonophilic migration of oligodendrocyte precursor cells by Eph-ephrin interaction*. Neuron Glia Biol, 2004. **1**(1): p. 73-83.
57. Cohen, R.I., et al., *A role for semaphorins and neuropilins in oligodendrocyte guidance*. J Neurochem, 2003. **85**(5): p. 1262-1278.
58. Goldberg, J.L., et al., *An oligodendrocyte lineage-specific semaphorin, Sema5A, inhibits axon growth by retinal ganglion cells*. J Neurosci, 2004. **24**(21): p. 4989-99.
59. Vora, P., et al., *Differential effects of growth factors on oligodendrocyte progenitor migration*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(8): p. 649-56.
60. Bribian, A., et al., *Anosmin-1 modulates the FGF-2-dependent migration of oligodendrocyte precursors in the developing optic nerve*. Mol Cell Neurosci, 2006. **33**(1): p. 2-14.
61. Piaton, G., et al., *Class 3 semaphorins influence oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination in adult central nervous system*. Brain, 2011. **134**(Pt 4): p. 1156-67.

62. Tsai, H.H., W.B. Macklin, and R.H. Miller, *Netrin-1 is required for the normal development of spinal cord oligodendrocytes*. J Neurosci, 2006. **26**(7): p. 1913-22.
63. Despeaux, M., et al., *Focal adhesion kinase splice variants maintain primitive acute myeloid leukemia cells through altered Wnt signaling*. Stem Cells, 2012. **30**(8): p. 1597-610.
64. Zhou, Y., R.A. Gunput, and R.J. Pasterkamp, *Semaphorin signaling: progress made and promises ahead*. Trends Biochem Sci, 2008. **33**(4): p. 161-70.
65. Kolodkin, A.L., et al., *Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo*. Neuron, 1992. **9**(5): p. 831-45.
66. Luo, Y., D. Raible, and J.A. Raper, *Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones*. Cell, 1993. **75**(2): p. 217-27.
67. Yazdani, U. and J.R. Terman, *The semaphorins*. Genome Biol, 2006. **7**(3): p. 211.
68. Kruger, R.P., J. Aurandt, and K.L. Guan, *Semaphorins command cells to move*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(10): p. 789-800.
69. Tran, T.S., A.L. Kolodkin, and R. Bharadwaj, *Semaphorin regulation of cellular morphology*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 263-92.
70. Gherardi, E., et al., *The sema domain*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(6): p. 669-78.
71. Hota, P.K. and M. Buck, *Plexin structures are coming: opportunities for multilevel investigations of semaphorin guidance receptors, their cell signaling mechanisms, and functions*. Cell Mol Life Sci, 2012.
72. Negishi, M., I. Oinuma, and H. Katoh, *Plexins: axon guidance and signal transduction*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(12): p. 1363-71.
73. Bechara, A., et al., *FAK-MAPK-dependent adhesion disassembly downstream of L1 contributes to semaphorin3A-induced collapse*. EMBO J, 2008. **27**(11): p. 1549-62.
74. Bashaw, G.J. and R. Klein, *Signaling from axon guidance receptors*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a001941.
75. Pasterkamp, R.J., *Getting neural circuits into shape with semaphorins*. Nat Rev Neurosci, 2012. **13**(9): p. 605-18.
76. He, Z., et al., *Knowing how to navigate: mechanisms of semaphorin signaling in the nervous system*. Sci STKE, 2002. **2002**(119): p. re1.
77. Chadborn, N.H., et al., *PTEN couples Sema3A signalling to growth cone collapse*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 5): p. 951-7.
78. Gelfand, M.V., S. Hong, and C. Gu, *Guidance from above: common cues direct distinct signaling outcomes in vascular and neural patterning*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(3): p. 99-110.
79. Chacon, M.R., G. Fernandez, and B. Rico, *Focal adhesion kinase functions downstream of Sema3A signaling during axonal remodeling*. Mol Cell Neurosci, 2010. **44**(1): p. 30-42.
80. Kantor, D.B., et al., *Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans*. Neuron, 2004. **44**(6): p. 961-75.
81. Kumanogoh, A., et al., *Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2*. Nature, 2002. **419**(6907): p. 629-33.
82. Nkyimbeng-Takwi, E. and S.P. Chapoval, *Biology and function of neuroimmune semaphorins 4A and 4D*. Immunol Res, 2011. **50**(1): p. 10-21.

83. Mizui, M., A. Kumanogoh, and H. Kikutani, *Immune semaphorins: novel features of neural guidance molecules*. J Clin Immunol, 2009. **29**(1): p. 1-11.
84. Godenschwege, T.A., et al., *Bi-directional signaling by Semaphorin 1a during central synapse formation in Drosophila*. Nat Neurosci, 2002. **5**(12): p. 1294-301.
85. Toyofuku, T., et al., *Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2*. Genes Dev, 2004. **18**(4): p. 435-47.
86. Haklai-Topper, L., et al., *Cis interaction between Semaphorin6A and Plexin-A4 modulates the repulsive response to Sema6A*. EMBO J, 2010. **29**(15): p. 2635-45.
87. Browne, K., et al., *Transmembrane semaphorin5B is proteolytically processed into a repulsive neural guidance cue*. J Neurochem, 2012. **123**(1): p. 135-46.
88. Raper, J.A., *Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates*. Curr Opin Neurobiol, 2000. **10**(1): p. 88-94.
89. Taniguchi, Y., et al., *Sema4D deficiency results in an increase in the number of oligodendrocytes in healthy and injured mouse brains*. J Neurosci Res, 2009. **87**(13): p. 2833-41.
90. Swiercz, J.M., et al., *Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology*. Neuron, 2002. **35**(1): p. 51-63.
91. Moreau-Fauvarque, C., et al., *The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion*. J Neurosci, 2003. **23**(27): p. 9229-39.
92. Kikutani, H. and A. Kumanogoh, *Semaphorins in interactions between T cells and antigen-presenting cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 159-67.
93. Zhu, L., et al., *Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(5): p. 1621-6.
94. Encinas, J.A., et al., *Cloning, expression, and genetic mapping of Sema W, a member of the semaphorin family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2491-6.
95. Schultze, W., et al., *Semaphorin4F interacts with the synapse-associated protein SAP90/PSD-95*. J Neurochem, 2001. **78**(3): p. 482-9.
96. Parrinello, S., et al., *NF1 loss disrupts Schwann cell-axonal interactions: a novel role for semaphorin 4F*. Genes Dev, 2008. **22**(23): p. 3335-48.
97. Ilic, D., et al., *Focal adhesion kinase is not essential for in vitro and in vivo differentiation of ES cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **209**(1): p. 300-9.
98. Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 56-68.
99. Cox, B.D., et al., *New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation*. J Cell Biochem, 2006. **99**(1): p. 35-52.
100. Schaller, M.D., *Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1540**(1): p. 1-21.
101. Schlaepfer, D.D. and S.K. Mitra, *Multiple connections link FAK to cell motility and invasion*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(1): p. 92-101.
102. Chen, R., et al., *Regulation of the PH-domain-containing tyrosine kinase Etk by focal adhesion kinase through the FERM domain*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(5): p. 439-44.

103. Kadare, G., et al., *PIAS1-mediated sumoylation of focal adhesion kinase activates its autophosphorylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 47434-40.
104. Schlaepfer, D.D., S.K. Mitra, and D. Ilic, *Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1692**(2-3): p. 77-102.
105. Schaller, M.D., *Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 7): p. 1007-13.
106. Ossovsckaya, V., et al., *FAK nuclear export signal sequences*. FEBS Lett, 2008. **582**(16): p. 2402-6.
107. Wozniak, M.A., et al., *Focal adhesion regulation of cell behavior*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1692**(2-3): p. 103-19.
108. Schaller, M.D., C.A. Borgman, and J.T. Parsons, *Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(2): p. 785-91.
109. Frame, M.C., et al., *The FERM domain: organizing the structure and function of FAK*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(11): p. 802-14.
110. Zheng, Y., et al., *FAK phosphorylation by ERK primes ras-induced tyrosine dephosphorylation of FAK mediated by PIN1 and PTP-PEST*. Mol Cell, 2009. **35**(1): p. 11-25.
111. Lim, S.T., et al., *Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation*. Mol Cell, 2008. **29**(1): p. 9-22.
112. Jones, G. and G. Stewart, *Nuclear import of N-terminal FAK by activation of the FcepsilonRI receptor in RBL-2H3 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(1): p. 39-45.
113. Yi, X.P., et al., *Subcellular redistribution of focal adhesion kinase and its related nonkinase in hypertrophic myocardium*. Hypertension, 2003. **41**(6): p. 1317-23.
114. Corsi, J.M., et al., *Organization and post-transcriptional processing of focal adhesion kinase gene*. BMC Genomics, 2006. **7**: p. 198.
115. Burgaya, F., et al., *Focal adhesion kinase in rat central nervous system*. Eur J Neurosci, 1995. **7**(8): p. 1810-21.
116. Burgaya, F., et al., *Alternatively spliced focal adhesion kinase in rat brain with increased autophosphorylation activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28720-5.
117. Toutant, M., et al., *Autophosphorylation of Tyr397 and its phosphorylation by Src-family kinases are altered in focal-adhesion-kinase neuronal isoforms*. Biochem J, 2000. **348 Pt 1**: p. 119-28.
118. Burgaya, F. and J.A. Girault, *Cloning of focal adhesion kinase, pp125FAK, from rat brain reveals multiple transcripts with different patterns of expression*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. **37**(1-2): p. 63-73.
119. Toutant, M., et al., *Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(22): p. 7731-43.
120. Messina, S., et al., *Specific interactions of neuronal focal adhesion kinase isoforms with Src kinases and amphiphysin*. J Neurochem, 2003. **84**(2): p. 253-65.
121. Ilic, D., et al., *Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice*. Nature, 1995. **377**(6549): p. 539-44.
122. Antonyak, M.A. and R.A. Cerione, *Ras and the FAK paradox*. Mol Cell, 2009. **35**(2): p. 141-2.

123. Xie, Z., et al., *Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration*. *Cell*, 2003. **114**(4): p. 469-82.
124. Hur, E.M., Saijilafu, and F.Q. Zhou, *Growing the growth cone: remodeling the cytoskeleton to promote axon regeneration*. *Trends Neurosci*, 2012. **35**(3): p. 164-74.
125. Vitriol, E.A. and J.Q. Zheng, *Growth cone travel in space and time: the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane*. *Neuron*, 2012. **73**(6): p. 1068-81.
126. Rico, B., et al., *Control of axonal branching and synapse formation by focal adhesion kinase*. *Nat Neurosci*, 2004. **7**(10): p. 1059-69.
127. Chacon, M.R., et al., *Focal adhesion kinase regulates actin nucleation and neuronal filopodia formation during axonal growth*. *Development*, 2012. **139**(17): p. 3200-10.
128. Chacon, M.R. and P. Fazzari, *FAK: dynamic integration of guidance signals at the growth cone*. *Cell Adh Migr*, 2011. **5**(1): p. 52-5.
129. Myers, J.P., et al., *Focal adhesion kinase modulates Cdc42 activity downstream of positive and negative axon guidance cues*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 12): p. 2918-29.
130. Li, W., et al., *Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling*. *Nat Neurosci*, 2004. **7**(11): p. 1213-21.
131. Liu, G., et al., *Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction*. *Nat Neurosci*, 2004. **7**(11): p. 1222-32.
132. Ren, X.R., et al., *Focal adhesion kinase in netrin-1 signaling*. *Nat Neurosci*, 2004. **7**(11): p. 1204-12.
133. Moore, S.W., et al., *Netrin-1 Attracts Axons through FAK-Dependent Mechanotransduction*. *J Neurosci*, 2012. **32**(34): p. 11574-85.
134. Woo, S., D.J. Rowan, and T.M. Gomez, *Retinotopic mapping requires focal adhesion kinase-mediated regulation of growth cone adhesion*. *J Neurosci*, 2009. **29**(44): p. 13981-91.
135. Myers, J.P. and T.M. Gomez, *Focal adhesion kinase promotes integrin adhesion dynamics necessary for chemotropic turning of nerve growth cones*. *J Neurosci*, 2011. **31**(38): p. 13585-95.
136. Cirulli, V. and M. Yebra, *Netrins: beyond the brain*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(4): p. 296-306.
137. Luo, L., *Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2002. **18**: p. 601-35.
138. Bilimoria, P.M. and A. Bonni, *Molecular Control of Axon Branching*. *Neuroscientist*, 2012.
139. Dent, E.W., et al., *Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton*. *J Neurosci*, 2004. **24**(12): p. 3002-12.
140. Schlomann, U., et al., *The stimulation of dendrite growth by Sema3A requires integrin engagement and focal adhesion kinase*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 12): p. 2034-42.
141. Monje, F.J., et al., *Focal adhesion kinase regulates neuronal growth, synaptic plasticity and hippocampus-dependent spatial learning and memory*. *Neurosignals*, 2012. **20**(1): p. 1-14.

142. Yuste, R. and T. Bonhoeffer, *Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity*. Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 1071-89.
143. Urena, J.M., et al., *Expression, synaptic localization, and developmental regulation of Ack1/Pyk1, a cytoplasmic tyrosine kinase highly expressed in the developing and adult brain*. J Comp Neurol, 2005. **490**(2): p. 119-32.
144. La Torre, A., et al., *Expression pattern of ACK1 tyrosine kinase during brain development in the mouse*. Gene Expr Patterns, 2006. **6**(8): p. 886-92.
145. Yokoyama, N. and W.T. Miller, *Biochemical properties of the Cdc42-associated tyrosine kinase ACK1. Substrate specificity, autophosphorylation, and interaction with Hck*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 47713-23.
146. Yokoyama, N., J. Loughheed, and W.T. Miller, *Phosphorylation of WASP by the Cdc42-associated kinase ACK1: dual hydroxyamino acid specificity in a tyrosine kinase*. J Biol Chem, 2005. **280**(51): p. 42219-26.
147. Eisenmann, K.M., et al., *Melanoma chondroitin sulphate proteoglycan regulates cell spreading through Cdc42, Ack-1 and p130cas*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(8): p. 507-13.
148. Modzelewska, K., et al., *Ack1 mediates Cdc42-dependent cell migration and signaling to p130Cas*. J Biol Chem, 2006. **281**(49): p. 37527-35.
149. Prieto-Echague, V. and W.T. Miller, *Regulation of ack-family nonreceptor tyrosine kinases*. J Signal Transduct, 2011. **2011**: p. 742372.
150. Gatti, A., *Nerve growth factor (NGF) induces a rapid and sustained downregulation of the focal adhesion kinase (FAK)*. Cell Mol Neurobiol, 2004. **24**(3): p. 461-75.
151. Matsuda, S., et al., *Brain-derived neurotrophic factor induces migration of endothelial cells through a TrkB-ERK-integrin alphaVbeta3-FAK cascade*. J Cell Physiol, 2012. **227**(5): p. 2123-9.
152. Kolkova, K., et al., *Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway*. J Neurosci, 2000. **20**(6): p. 2238-46.
153. Kleene, R., et al., *NCAM-induced neurite outgrowth depends on binding of calmodulin to NCAM and on nuclear import of NCAM and fak fragments*. J Neurosci, 2010. **30**(32): p. 10784-98.
154. Waites, C.L. and C.C. Garner, *Presynaptic function in health and disease*. Trends Neurosci, 2011. **34**(6): p. 326-37.
155. Tolia, K.F., J.G. Duman, and K. Um, *Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins*. Prog Neurobiol, 2011. **94**(2): p. 133-48.
156. Shi, Y., et al., *Focal adhesion kinase acts downstream of EphB receptors to maintain mature dendritic spines by regulating cofilin activity*. J Neurosci, 2009. **29**(25): p. 8129-42.
157. Le Bras, B., et al., *VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain*. Nat Neurosci, 2006. **9**(3): p. 340-8.
158. Hayakawa, K., et al., *Vascular endothelial growth factor regulates the migration of oligodendrocyte precursor cells*. J Neurosci, 2011. **31**(29): p. 10666-70.
159. Miyamoto, Y., J. Yamauchi, and A. Tanoue, *Cdk5 phosphorylation of WAVE2 regulates oligodendrocyte precursor cell migration through nonreceptor tyrosine kinase Fyn*. J Neurosci, 2008. **28**(33): p. 8326-37.

160. Rajasekharan, S., et al., *Netrin 1 and Dcc regulate oligodendrocyte process branching and membrane extension via Fyn and RhoA*. Development, 2009. **136**(3): p. 415-26.
161. Rajasekharan, S., et al., *A central role for RhoA during oligodendroglial maturation in the switch from netrin-1-mediated chemorepulsion to process elaboration*. J Neurochem, 2010. **113**(6): p. 1589-97.
162. Lafrenaye, A.D. and B. Fuss, *Focal adhesion kinase can play unique and opposing roles in regulating the morphology of differentiating oligodendrocytes*. J Neurochem, 2010. **115**(1): p. 269-82.
163. Hoshina, N., et al., *Focal adhesion kinase regulates laminin-induced oligodendroglial process outgrowth*. Genes Cells, 2007. **12**(11): p. 1245-54.
164. Forrest, A.D., et al., *Focal adhesion kinase (FAK): A regulator of CNS myelination*. J Neurosci Res, 2009. **87**(15): p. 3456-64.
165. Camara, J., et al., *Integrin-mediated axoglial interactions initiate myelination in the central nervous system*. J Cell Biol, 2009. **185**(4): p. 699-712.
166. *Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins*. Semaphorin Nomenclature Committee. Cell, 1999. **97**(5): p. 551-2.
167. Ono, K., et al., *Focal ventricular origin and migration of oligodendrocyte precursors into the chick optic nerve*. Neuron, 1997. **19**(2): p. 283-92.
168. Spassky, N., et al., *The early steps of oligodendrogenesis: insights from the study of the plp lineage in the brain of chicks and rodents*. Dev Neurosci, 2001. **23**(4-5): p. 318-26.
169. Merchan, P., et al., *Sonic hedgehog promotes the migration and proliferation of optic nerve oligodendrocyte precursors*. Mol Cell Neurosci, 2007. **36**(3): p. 355-68.
170. Sugimoto, Y., et al., *Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve*. Development, 2001. **128**(17): p. 3321-30.
171. Aurandt, J., W. Li, and K.L. Guan, *Semaphorin 4D activates the MAPK pathway downstream of plexin-B1*. Biochem J, 2006. **394**(Pt 2): p. 459-64.
172. Pasterkamp, R.J., et al., *Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 398-405.
173. Burgaya, F., et al., *Semaphorin 6C leads to GSK-3-dependent growth cone collapse and redistributes after entorhino-hippocampal axotomy*. Mol Cell Neurosci, 2006. **33**(3): p. 321-34.
174. Lim, S.T., et al., *FERM control of FAK function: implications for cancer therapy*. Cell Cycle, 2008. **7**(15): p. 2306-14.
175. Slack-Davis, J.K., et al., *Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor*. J Biol Chem, 2007. **282**(20): p. 14845-52.
176. Stone, S.S., et al., *Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory*. J Neurosci, 2011. **31**(38): p. 13469-84.
177. Kee, N., et al., *Imaging activation of adult-generated granule cells in spatial memory*. Nat Protoc, 2007. **2**(12): p. 3033-44.
178. Majoul, I., et al., *Many faces of drebrin: from building dendritic spines and stabilizing gap junctions to shaping neurite-like cell processes*. Histochem Cell Biol, 2007. **127**(4): p. 355-61.
179. Takahashi, H., T. Mizui, and T. Shirao, *Down-regulation of drebrin A expression suppresses synaptic targeting of NMDA receptors in developing hippocampal neurones*. J Neurochem, 2006. **97 Suppl 1**: p. 110-5.

180. Mizui, T., et al., *Overexpression of drebrin A in immature neurons induces the accumulation of F-actin and PSD-95 into dendritic filopodia, and the formation of large abnormal protrusions*. Mol Cell Neurosci, 2005. **30**(4): p. 630-8.
181. Kobayashi, R., et al., *Antisense knockdown of drebrin A, a dendritic spine protein, causes stronger preference, impaired pre-pulse inhibition, and an increased sensitivity to psychostimulant*. Neurosci Res, 2004. **49**(2): p. 205-17.
182. Dun, X.P., et al., *Drebrin controls neuronal migration through the formation and alignment of the leading process*. Mol Cell Neurosci, 2012. **49**(3): p. 341-50.
183. Hayashi, K., et al., *Modulatory role of drebrin on the cytoskeleton within dendritic spines in the rat cerebral cortex*. J Neurosci, 1996. **16**(22): p. 7161-70.
184. Lisman, J., R. Yasuda, and S. Raghavachari, *Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation*. Nat Rev Neurosci, 2012. **13**(3): p. 169-82.
185. Okamoto, K., et al., *The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(15): p. 6418-23.
186. Lisman, J., H. Schulman, and H. Cline, *The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(3): p. 175-90.
187. Craft, G.E., et al., *The in vivo phosphorylation sites in multiple isoforms of amphiphysin I from rat brain nerve terminals*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(6): p. 1146-61.
188. Choudhury, M., et al., *Amphiphysin I phosphorylation on residue threonine 260 in a pentylenetetrazole-induced seizure model*. Neurosci Lett, 2008. **444**(3): p. 245-9.
189. Stevens, R.J. and J.T. Littleton, *Synaptic growth: dancing with adducin*. Curr Biol, 2011. **21**(10): p. R402-5.
190. Uematsu, K., et al., *Regulation of spinophilin Ser94 phosphorylation in neostriatal neurons involves both DARPP-32-dependent and independent pathways*. J Neurochem, 2005. **95**(6): p. 1642-52.
191. Futter, M., et al., *Phosphorylation of spinophilin by ERK and cyclin-dependent PK 5 (Cdk5)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(9): p. 3489-94.
192. Welch, J.M., D. Wang, and G. Feng, *Differential mRNA expression and protein localization of the SAP90/PSD-95-associated proteins (SAPAPs) in the nervous system of the mouse*. J Comp Neurol, 2004. **472**(1): p. 24-39.
193. Okabe, S., *Molecular anatomy of the postsynaptic density*. Mol Cell Neurosci, 2007. **34**(4): p. 503-18.
194. Chen, H.J., et al., *A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II*. Neuron, 1998. **20**(5): p. 895-904.
195. Kim, J.H., et al., *SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family*. Neuron, 1998. **20**(4): p. 683-91.
196. Rumbaugh, G., et al., *SynGAP regulates synaptic strength and mitogen-activated protein kinases in cultured neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(12): p. 4344-51.
197. Gascon, E., L. Vutskits, and J.Z. Kiss, *Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons*. Brain Res Rev, 2007. **56**(1): p. 101-18.
198. Uemura, M. and M. Takeichi, *Alpha N-catenin deficiency causes defects in axon migration and nuclear organization in restricted regions of the mouse brain*. Dev Dyn, 2006. **235**(9): p. 2559-66.

199. Abe, K., et al., *Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alpha N-catenin*. Nat Neurosci, 2004. **7**(4): p. 357-63.
200. Togashi, H., et al., *Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis*. Neuron, 2002. **35**(1): p. 77-89.
201. Hund, T.J., et al., *A beta(IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(10): p. 3508-19.
202. Czogalla, A. and A.F. Sikorski, *Spectrin and calpain: a 'target' and a 'sniper' in the pathology of neuronal cells*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(17): p. 1913-24.
203. Song, J.Y., et al., *Neurologin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(3): p. 1100-5.
204. Budreck, E.C. and P. Scheiffele, *Neurologin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses*. Eur J Neurosci, 2007. **26**(7): p. 1738-48.
205. Varoqueaux, F., et al., *Neurologins determine synapse maturation and function*. Neuron, 2006. **51**(6): p. 741-54.
206. Mundel, P., et al., *Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes*. J Cell Biol, 1997. **139**(1): p. 193-204.
207. Deller, T., et al., *Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10494-9.
208. Vlachos, A., et al., *Synaptopodin regulates plasticity of dendritic spines in hippocampal neurons*. J Neurosci, 2009. **29**(4): p. 1017-33.
209. Kandel, E.R., Schwartz, J. H. Jessell, T.M., *Principles of Neural Science*. 4th ed2000, New York: McGraw-Hill.
210. Yao, I., et al., *Synaptic and nuclear localization of brain-enriched guanylate kinase-associated protein*. J Neurosci, 2002. **22**(13): p. 5354-64.
211. Deguchi, M., et al., *BEGAIN (brain-enriched guanylate kinase-associated protein), a novel neuronal PSD-95/SAP90-binding protein*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26269-72.
212. Chen, L.T., A.G. Gilman, and T. Kozasa, *A candidate target for G protein action in brain*. J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 26931-8.
213. Wang, W., et al., *Nemitin, a novel Map8/Map1s interacting protein with Wd40 repeats*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e33094.
214. Andreev, J., et al., *Identification of a new Pyk2 target protein with Arf-GAP activity*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 2338-50.
215. Wong, K., et al., *Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway*. Cell, 2001. **107**(2): p. 209-21.
216. Guerrier, S., et al., *The F-BAR domain of srGAP2 induces membrane protrusions required for neuronal migration and morphogenesis*. Cell, 2009. **138**(5): p. 990-1004.
217. Munton, R.P., et al., *Qualitative and quantitative analyses of protein phosphorylation in naive and stimulated mouse synaptosomal preparations*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(2): p. 283-93.
218. Ballif, B.A., et al., *Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(11): p. 1093-101.
219. Wisniewski, J.R., et al., *Brain phosphoproteome obtained by a FASP-based method reveals plasma membrane protein topology*. J Proteome Res, 2010. **9**(6): p. 3280-9.

220. Zhang, G., et al., *Quantitative phosphotyrosine proteomics of EphB2 signaling by stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC)*. J Proteome Res, 2006. **5**(3): p. 581-8.
221. Pasterkamp, R.J. and A.L. Kolodkin, *Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity*. Curr Opin Neurobiol, 2003. **13**(1): p. 79-89.
222. Pasterkamp, R.J. and R.J. Giger, *Semaphorin function in neural plasticity and disease*. Curr Opin Neurobiol, 2009. **19**(3): p. 263-74.
223. Barnes, G., et al., *Temporal specific patterns of semaphorin gene expression in rat brain after kainic acid-induced status epilepticus*. Hippocampus, 2003. **13**(1): p. 1-20.
224. Yang, J., et al., *Genetic background regulates semaphorin gene expression and epileptogenesis in mouse brain after kainic acid status epilepticus*. Neuroscience, 2005. **131**(4): p. 853-69.
225. Paradis, S., et al., *An RNAi-based approach identifies molecules required for glutamatergic and GABAergic synapse development*. Neuron, 2007. **53**(2): p. 217-32.
226. Cohen, R.I., et al., *A role for semaphorins and neuropilins in oligodendrocyte guidance*. J Neurochem, 2003. **85**(5): p. 1262-78.
227. Bernard, F., et al., *Role of transmembrane semaphorin Sema6A in oligodendrocyte differentiation and myelination*. Glia, 2012. **60**(10): p. 1590-604.
228. Basile, J.R., et al., *MT1-MMP controls tumor-induced angiogenesis through the release of semaphorin 4D*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6899-905.
229. Chabbert-de Ponnat, I., et al., *Soluble CD100 functions on human monocytes and immature dendritic cells require plexin C1 and plexin B1, respectively*. Int Immunol, 2005. **17**(4): p. 439-47.
230. Yamazaki, J., H. Katoh, and M. Negishi, *Lysophosphatidic acid and thrombin receptors require both G alpha12 and G alpha13 to regulate axonal morphology in hippocampal neurons*. Biol Pharm Bull, 2008. **31**(12): p. 2216-22.
231. Rajasekharan, S., *Intracellular signaling mechanisms directing oligodendrocyte precursor cell migration*. J Neurosci, 2008. **28**(50): p. 13365-7.
232. Pasterkamp, R.J. and J. Verhaagen, *Semaphorins in axon regeneration: developmental guidance molecules gone wrong?* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006. **361**(1473): p. 1499-511.
233. Ishii, K., et al., *Increase of oligodendrocyte progenitor cells after spinal cord injury*. J Neurosci Res, 2001. **65**(6): p. 500-7.
234. Wu, H., et al., *Sema4C participates in myogenic differentiation in vivo and in vitro through the p38 MAPK pathway*. Eur J Cell Biol, 2007. **86**(6): p. 331-44.
235. Nikolic, M., *The molecular mystery of neuronal migration: FAK and Cdk5*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(1): p. 1-5.
236. Yano, H., et al., *Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion*. J Cell Biol, 2004. **166**(2): p. 283-95.
237. Schaller, M.D., *FAK and paxillin: regulators of N-cadherin adhesion and inhibitors of cell migration?* J Cell Biol, 2004. **166**(2): p. 157-9.
238. Easley, C.A.t., et al., *CaMK-II promotes focal adhesion turnover and cell motility by inducing tyrosine dephosphorylation of FAK and paxillin*. Cell Motil Cytoskeleton, 2008. **65**(8): p. 662-74.

239. Cho, J.Y., et al., *The extracellular matrix proteoglycan perlecan facilitates transmembrane semaphorin-mediated repulsive guidance*. Genes Dev, 2012. **26**(19): p. 2222-35.
240. Jiang, X., J. Sinnett-Smith, and E. Rozengurt, *Differential FAK phosphorylation at Ser-910, Ser-843 and Tyr-397 induced by angiotensin II, LPA and EGF in intestinal epithelial cells*. Cell Signal, 2007. **19**(5): p. 1000-10.
241. Grove, M., et al., *FAK is required for axonal sorting by Schwann cells*. J Cell Biol, 2007. **176**(3): p. 277-82.
242. Contestabile, A., et al., *Localization of focal adhesion kinase isoforms in cells of the central nervous system*. Int J Dev Neurosci, 2003. **21**(2): p. 83-93.
243. Derkinderen, P., et al., *Differential regulation of FAK+ and PYK2/Cakbeta, two related tyrosine kinases, in rat hippocampal slices: effects of LPA, carbachol, depolarization and hyperosmolarity*. Eur J Neurosci, 1998. **10**(5): p. 1667-75.
244. Siciliano, J.C., et al., *Differential regulation of proline-rich tyrosine kinase 2/cell adhesion kinase beta (PYK2/CAKbeta) and pp125(FAK) by glutamate and depolarization in rat hippocampus*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 28942-6.
245. Derkinderen, P., et al., *Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide*. Science, 1996. **273**(5282): p. 1719-22.
246. Derkinderen, P., et al., *Dual role of Fyn in the regulation of FAK+6,7 by cannabinoids in hippocampus*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 38289-96.
247. Beggs, H.E., et al., *NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn)*. J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8310-9.
248. Girault, J.A., et al., *FAK and PYK2/CAKbeta in the nervous system: a link between neuronal activity, plasticity and survival?* Trends Neurosci, 1999. **22**(6): p. 257-63.
249. Collett, J.W. and R.E. Steele, *Alternative splicing of a neural-specific Src mRNA (Src+) is a rapid and protein synthesis-independent response to neural induction in Xenopus laevis*. Dev Biol, 1993. **158**(2): p. 487-95.
250. Grabowski, P., *Alternative splicing takes shape during neuronal development*. Curr Opin Genet Dev, 2011. **21**(4): p. 388-94.
251. Ohshima, T., et al., *Modulation of Reelin signaling by Cyclin-dependent kinase 5*. Brain Res, 2007. **1140**: p. 84-95.
252. Licatalosi, D.D. and R.B. Darnell, *Splicing regulation in neurologic disease*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 93-101.
253. Ivankovic-Dikic, I., et al., *Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 574-81.
254. Diaz-Hernandez, M., et al., *Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 22): p. 3717-28.
255. Moeller, M.L., et al., *EphB receptors regulate dendritic spine morphogenesis through the recruitment/phosphorylation of focal adhesion kinase and RhoA activation*. J Biol Chem, 2006. **281**(3): p. 1587-98.
256. Manser, E., et al., *A non-receptor tyrosine kinase that inhibits the GTPase activity of p21cdc42*. Nature, 1993. **363**(6427): p. 364-7.
257. Moore, S.W., N. Biais, and M.P. Sheetz, *Traction on immobilized netrin-1 is sufficient to reorient axons*. Science, 2009. **325**(5937): p. 166.
258. Biou, V., et al., *Interactions between drebrin and Ras regulate dendritic spine plasticity*. Eur J Neurosci, 2008. **27**(11): p. 2847-59.

259. Takahashi, H., et al., *Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis*. J Neurosci, 2003. **23**(16): p. 6586-95.
260. Harigaya, Y., et al., *Disappearance of actin-binding protein, drebrin, from hippocampal synapses in Alzheimer's disease*. J Neurosci Res, 1996. **43**(1): p. 87-92.
261. Chen, C., A. Wirth, and E. Ponimaskin, *Cdc42: an important regulator of neuronal morphology*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(3): p. 447-51.
262. Murakoshi, H., H. Wang, and R. Yasuda, *Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines*. Nature, 2011. **472**(7341): p. 100-4.
263. Bongiorno-Borbone, L., et al., *FAK and PYK2 interact with SAP90/PSD-95-Associated Protein-3*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(2): p. 641-6.
264. Ma, A., et al., *Serine phosphorylation of focal adhesion kinase in interphase and mitosis: a possible role in modulating binding to p130(Cas)*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(1): p. 1-12.
265. Fan, R.S., et al., *G protein-coupled receptor activation rapidly stimulates focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-843. Mediation by Ca²⁺, calmodulin, and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 24212-20.
266. Jacamo, R., et al., *FAK phosphorylation at Ser-843 inhibits Tyr-397 phosphorylation, cell spreading and migration*. J Cell Physiol, 2007. **210**(2): p. 436-44.
267. Deramautd, T.B., et al., *FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(7): p. 964-75.
268. Harlow, E.L., D.P., *Antibodies: A Laboratory Manual* 1988: CSHL Press.
269. Alcantara, S., et al., *Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse*. J Neurosci, 1998. **18**(19): p. 7779-99.
270. Alvarez-Dolado, M., et al., *Thyroid hormone regulates reelin and dab1 expression during brain development*. J Neurosci, 1999. **19**(16): p. 6979-93.
271. Bribian, A., et al., *A novel role for anosmin-1 in the adhesion and migration of oligodendrocyte precursors*. Dev Neurobiol, 2008. **68**(13): p. 1503-16.
272. McCarthy, K.D. and J. de Vellis, *Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue*. J Cell Biol, 1980. **85**(3): p. 890-902.
273. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
274. Obenauer, J.C., L.C. Cantley, and M.B. Yaffe, *Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3635-41.

ANEXO I.

Tablas de proteínas encontradas en los
experimentos de MS

<i>IPFAK</i>	código proteína	proteína	score	coverage	#proteínas	#péptidos únicos
p5	Q9QXS6	drebrina	805,6	44,33	2	8
	P34152	FAK	393,7	46,33	2	40
	Q6R891	Neurabina2	189,9	39,29	3	22
	Q9QYB8	beta-adducina	128,2	22,62	1	15
	Q61879	miosina-10	99,03	17,86	1	26
	Q61301	alfa-catenina	78,91	27,49	2	19
	P97434	fosfatasa de miosina de interacción con Rho	55,20	18,85	1	3
	Q5SXY1	citospina-B	54,66	14,81	2	13
	Q8CGF6	proteína 47 con repeticiones WD	46,43	15,22	1	10
	P46735	miosina-Ib	41,82	16,44	1	15
	P28738	cadena pesada de la kinesina5C	41,13	14,96	1	10
	Q9WT17	miosina-Ic	36,60	12,42	2	10
	Q3UH68	proteína con dominios de homología a LIM y calponina	29,30	8,80	1	6
	Q8K310	matrina-3	28,26	8,04	1	4
	Q69ZH9	RhoGAP 23	20,80	5,60	7	5
	Q8BG95	proteína fosfatasa 1	20,73	15,06	1	9
	P27546	MAP4	20,02	5,33	1	3
	Q68FH0	placofilina	19,69	4,87	1	4
	Q8VDD5	miosina-9	18,08	3,16	2	3
	Q7TSJ2	MAP6	15,31	12,36	1	7

Tabla A.I. Proteínas obtenidas de la inmunoprecipitación de FAK en muestras de cerebros P5. Se incluyen sólo las veinte primeras de la lista.

<i>IPFAK</i>	código proteína	proteína	score	coverage	# proteínas	#péptidos únicos
Control	P34152	FAK	436,56	17,71	2	18
	Q9QXS6	drebrina	243,52	18,41	1	8
	A2AJI0	proteína 1 con dominio MAP7	145,29	11,94	1	11
	Q7TSJ2	MAP6	111,81	33,33	1	17
	Q68FH0	placofilina	79,70	10,92	1	10
	Q80YA9	estimulador del supresor de ras 2	55,10	12,02	1	8
	Q9QWI6	inhibidor 1 de Src	54,78	7,84	1	7
	Q9QYC0	alfa-aducina	52,26	15,65	1	7
	Q35927	delta-2 catenina	38,69	6,26	1	5
	Q6PFD5	proteína 3 asociada a disk large	30,18	6,76	1	6
	Q9QYB8	beta-adducina	28,21	9,93	1	5
	P08553	polipéptido de neurofilamento medio	26,69	2,36	1	3
	P27546	MAP4	25,27	4,18	1	5
	Q8BJ42	proteína 2 asociada a disk large	24,02	9,25	1	7
	P28738	cadena pesada de kinesina5C	23,31	7,53	1	4
	Q8VD37	proteína 1 de interacción con proteína tipo Grb2	21,18	6,45	1	4
	Q8K310	matrina-3	18,60	6,38	1	3
	O14490	proteína 1 asociada a disk-large	18,38	7,47	2	5
	P98203	proteína con repeticiones armadillo delecionada en síndrome velo-cardio-facial	15,48	4,26	1	4
	Q7SIG6	Arf-GAP con dominios SH3, ANK y PH	10,11	2,51	1	2
PTZ	P34152	FAK	391,04	15,05	2	12
	Q9QXS6	drebrina	170,26	21,25	1	3
	Q9QXS6	proteína 1 con dominio MAP7	143,83	10,28	1	9
	Q9QYC0	alfa-aducina	69,27	14,56	1	8
	Q68FH0	placofilina	66,34	12,02	1	11
	Q7TSJ2	MAP6	60,66	22,19	1	13
	Q9C0H9	inhibidor 1 de señalización por Src	46,70	7,87	2	6
	P08553	polipéptido de neurofilamento medio	38,56	4,48	1	4
	Q35927	catenina delta-2	32,61	7,62	1	6
	Q8K310	matrina-1	29,56	9,69	1	6
	Q7SIG6	Arf-GAP con dominios SH3, ANK y PH	28,52	2,51	1	3
	Q8VD37	proteína 1 de interacción con proteína tipo Grb2	22,64	6,45	1	4
	Q9QUH6	SynGAP	22,49	4,89	3	4
	Q9QYB8	beta-aducina	22,24	8,97	1	4
	Q80YA9	estimulador del supresor de ras 2	21,98	2,42	3	3
	P27546	MAP4	19,65	6,67	1	4
	Q8R0S2	proteína 1 con motivos IQ y SEC7	18,59	3,54	2	3
	O14490	proteína 1 asociada a disk-large	13,96	6,14	3	5
	P28738	cadena pesada de kinesina5C	11,90	4,71	1	3
	Q6PFD5	proteína 3 asociada a disk-large	11,78	6,14	1	5

Tabla A.II. Proteínas obtenidas de la inmunoprecipitación de FAK en muestras de cerebros adultos control o tratados con PTZ. Se incluyen sólo las veinte primeras de la lista.

<i>IP Ack1</i>	código proteína	proteína	score	coverage	# proteínas	# péptidos únicos
P5	Q9QXS6	drebrina	439,10	38,24	1	4
	Q61879	miosina-10	85,96	8,30	2	10
	Q8C8R3	ankirina-2	83,71	7,77	1	19
	Q3UH68	proteína 1 con dominios LIM y de homología a calponina	55,95	8,51	1	9
	Q9QYB8	beta-adducina	54,27	9,24	1	7
	Q96SB3	neurabina-2	46,47	8,96	3	4
	P97434	fosfatasa de miosina que interacciona con Rho	37,97	10,45	1	6
	Q8VDD5	miosina-9	36,68	3,11	2	3
	Q69ZH9	RhoGAP23	31,10	8,97	1	7
	P27546	MAP4	30,72	6,67	1	4
	Q63622	homólogo de disks-large 2	29,71	8,10	2	5
	Q5SXY1	citospina-B	25,18	3,84	1	4
	P08553	polipéptido asociado a neurofilamento medio	25,03	2,36	1	3
	P14873	MAP1B	22,32	4,91	1	6
	Q62261	cadena beta de espectrina	21,66	1,61	1	4
	Q68FH0	placofilina-4	19,07	5,13	1	4
	Q8K310	matrina-3	18,19	6,38	1	3
	Q61301	alfa catenina-2	14,96	4,41	1	2
	Q9JMH9	miosina-18a	14,81	3,51	1	4
	Q8CCJ4	proteína FAM123A	13,86	1,64	1	1
	O54967	Ack1	11,35	5,69	1	3

Tabla A.III. Proteínas obtenidas de la inmunoprecipitación de Ack1 en muestras de cerebros P5. Se incluyen sólo las veinte primeras de la lista. Nótese que Ack1 no aparece entre las veinte primeras.

<i>IP Ack1</i>	código proteína	proteína	score	coverage	# proteínas	# péptidos únicos
control	Q9QXS6	drebrina	138,60	17,42	1	3
	Q9QYC0	alfa-adducina	98,30	20,95	1	12
	Q61301	alfa-catenina-2	84,87	10,07	1	5
	Q8K310	matrina-3	77,30	9,34	1	7
	Q68FH0	placofilina-4	75,48	11,51	1	10
	Q8CC35	sinaptopodina	71,79	9,15	1	5
	Q7TSJ2	MAP6	66,84	17,99	1	10
	Q9QYB8	beta-adducina	55,01	15,59	1	9
	Q9QWI6	inhibidor 1 de señalización por src	53,40	10,56	1	8
	A2AJA9	proteína no caracterizada C9orf172	49,78	7,39	1	6
	A2AJI0	proteína con dominio MAP7	40,57	8,75	1	5
	Q9QUH6	SynGAP	35,97	8,79	3	8
	P26231	alfa-catenina-1	31,46	4,08	4	1
	P27546	MAP4	31,29	7,38	1	5
	Q80YA9	estimulador del supresor de Ras 2	26,45	4,26	1	4
	P08553	polipéptido medio de neurofilamento	26,10	4,95	1	4
	Q6PFD5	proteína asociada a disks-large 3	23,96	12,59	1	7
	Q8BJ42	proteína asociada a disks-large 2	23,90	7,46	1	5
	Q8C8R3	ankirina-2	22,03	2,44	1	6
	P11798	proteína kinasa alfa tipo II dependiente de calcio/calmodulina	19,45	5,02	1	3
PTZ	Q9QXS6	drebrina	223,62	35,55	2	13
	Q9QYC0	alfa-adducina	119,80	29,39	1	17
	Q8K310	matrina-3	109,21	25,30	1	18
	Q7TSJ2	MAP6	107,89	48,90	1	26
	P28738	cadena pesada de kinesina5C	100,61	35,67	1	24
	Q61301	alfa-catenina-2	86,94	25,50	2	19
	P46660	alfa-internexina	83,95	35,12	1	15
	Q7TPR4	alfa-actinina-1	83,51	23,99	1	13
	Q9QYB8	beta-adducina	75,40	24,41	1	15
	Q6R891	neurabina-2	75,30	28,76	3	15
	Q6PH08	proteína 2 ERC	68,84	21,94	1	18
	P11798	proteína kinasa alfa tipo II dependiente de calcio/calmodulina	65,80	29,50	1	9
	P08553	polipéptido medio de neurofilamento	63,00	17,57	1	10
	Q68FH0	placofilina-4	56,35	12,18	1	11
	A2AJA9	proteína no caracterizada C9orf172	55,32	12,42	1	13
	Q8CC35	sinaptopodina	52,65	10,98	1	6
	Q91XM9	homólogo 2 a disks-large	46,98	22,30	1	1
	Q00PI9	proteína 2 tipo ribonucleoproteína U	44,37	19,60	1	6
	A2AJI0	proteína 1 con dominio MAP7	42,95	7,57	1	6
	Q9QWI6	inhibidor 1 de Src	32,72	7,68	1	1
	Q07912	Ack1	8,29	3,47	3	3

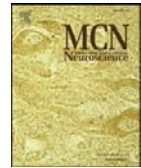
Tabla A.IV. Proteínas obtenidas de la inmunoprecipitación de Ack1 en muestras de cerebros adultos control o tratados con PTZ. Se incluyen sólo las veinte primeras de la lista. Ack1 no aparece en las muestras control, pero sí en las muestras PTZ aunque no entre las 20 primeras.

humano	ratón
T13	T13
S29	S29
Y155	Y155
T386	T386
A388	A388
S390	S390
S392	S392
Y397	Y428
T406	T437
Y407	Y438
Y570	Y608
T700	T738
S708	S746
S722	S760
S732	S770
S766	S804
V793	A831
S843	S881
S887	N925
S890	S928
S893	S931
S897	S935
Y898	Y936
S910	S948

Tabla A.V. Correspondencia en la nomenclatura de los residuos de la proteína FAK en humanos y en ratón

ANEXO II.

Publicación derivada de esta Tesis Doctoral



Expression of Semaphorin 4F in neurons and brain oligodendrocytes and the regulation of oligodendrocyte precursor migration in the optic nerve

Beatriz G. Armendáriz^{a,b,e,1}, Ana Bribian^{c,d,e,1}, Esther Pérez-Martínez^{a,b,e,1}, Albert Martínez^{a,b,e}, Fernando de Castro^{d,f}, Eduardo Soriano^{a,b,e}, Ferran Burgaya^{a,b,e,*}

^a Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Baldiri Reixac, 10, 08028, Barcelona, Spain

^b CIBERNED (ISCIII), Spain

^c Institute for Bioengineering of Catalonia, IBEC-PCB, Baldiri Reixac, 9, 08028, Barcelona, Spain

^d Developmental Neurobiology Lab., Hospital Nacional de Paraplégicos, 45005 Toledo, Spain

^e Cell Biology Department, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Diagonal, 645, 08028, Barcelona, Spain

^f Instituto Cajal, CSIC, Dr. Arce, 37, 28002, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 March 2011

Revised 9 September 2011

Accepted 12 September 2011

Available online 17 September 2011

Keywords:

Semaphorin
Oligodendrocyte
Guidance
Optic nerve
Brain

ABSTRACT

Semaphorins are secreted or membrane-anchored proteins that play critical roles in neural development and adult brain plasticity. Semaphorin 4F is a transmembrane semaphorin found on glutamatergic synapses, in which it is attached to the PSD-95-scaffolding protein. Here we further examined the expression of Semaphorin 4F by raising specific antibodies. We show that Semaphorin 4F protein is widely expressed by neurons during neural development and in the adult brain. We also demonstrate a preferential localization of this protein in postsynaptic dendrites. Moreover, Semaphorin 4F is expressed not only by neurons but also by oligodendrocyte precursors in the optic nerve and along the migratory pathways of oligodendroglial cells, and also by subsets of postnatal oligodendroglial cells in the brain. Finally, *in vitro* experiments demonstrate that endogenous Semaphorin 4F expressed by brain cells of oligodendroglial lineage regulates the outgrowth migration of oligodendrocyte precursors and promotes their differentiation. The present data extend our knowledge about the expression of Semaphorin 4F and uncover a novel function in the control of oligodendrocyte precursor migration in the developing brain.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Semaphorins serve as axon guidance molecules – mostly repulsive – in neural tissue (Bagnard et al., 1998; Falk et al., 2005; Fenstermaker et al., 2004; He et al., 2002; Kantor et al., 2004; Pasterkamp and Kolodkin, 2003; Pasterkamp et al., 2003; Skaliya et al., 1998; Song et al., 1998). In addition, these molecules influence the migration of neurons (Kerjan et al., 2005; Marin and Rubenstein, 2003; Raper, 2000; Tamagnone and Comoglio, 2004) and glial cells (Cohen et al., 2003; Spassky et al., 2002; Taniguchi et al., 2009). Semaphorins are well characterized as brain circuit regulators but are also involved in the responses of the immune system (Kikutani and Kumanogoh, 2003) as well as in cardiovascular development (Kruger et al., 2005; Toyofuku et al., 2004), among other less characterized, organogenetic programs (reviewed in Roth et al., 2008).

While in vertebrates the most studied semaphorins are secreted proteins that diffuse over the extracellular matrix (class 3 semaphorins),

several members are transmembrane (classes 4 to 6) or membrane-attached proteins (class 7) (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999). When expressed on the surface of neurons, these semaphorins affect the formation of synapses during development, or plasticity events in the adult (Dityatev et al., 2008; Skaper et al., 2001). Various studies have addressed class 3 semaphorins and CNS lesions (Kaneko et al., 2006; Lee et al., 2010; Pasterkamp and Verhaagen, 2001). However, transmembrane counterparts may also be involved in these effects, especially class 4 semaphorins, which constitute the largest transmembrane subclass (Raper, 2000). In fact, Semaphorin 4D induces growth cone collapse of CNS axons (Giraudon et al., 2004; Swiercz et al., 2002), it is expressed by oligodendrocytes and it is upregulated after adult CNS lesion (Moreau-Fauvarque et al., 2003). In the Peripheral Nervous System (PNS), Semaphorin 4F is involved in the maintenance of Schwann cell–axon interaction through downregulation of the Ras/Raf/ERK pathway (Parrinello et al., 2008). Of note, some reports point to a double role of oligodendroglial cells as being synthesizers of and sensitive to multiple members of the semaphorin family (Cohen, 2005; Taniguchi et al., 2009).

Class 5 and class 6 semaphorins in the CNS have also been reported. Semaphorin 5A is specific of oligodendroglial lineage and it inhibits axon growth (Goldberg et al., 2004; Hilario et al., 2009; Kantor et al.,

* Corresponding author at: Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Baldiri Reixac, 10; 08028, Barcelona, Spain. Fax: +34 934037116.

E-mail address: ferran.burgaya@irbbarcelona.org (F. Burgaya).

¹ Both authors contributed equally to this study.

FINANCIACIÓN

disfrutada para la elaboración de esta Tesis.

1. Beca FI de la Generalitat de Catalunya. Enero 2009- Julio2009.
2. Beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia del Gobierno de España. Agosto 2009-Diciembre 2012.

